

# Hydroxyethylstärke-Hydroxyethylmethacrylat- Hydrogele als Freisetzungssystem für Proteine

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo- Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ariane Dorothea Annette Schwoerer  
aus Limburg a.d. Lahn

1. Referent: Prof. Dr. Henning Menzel  
2. Referent: Prof. Dr. Rolf Daniels

Eingereicht am: 16.09.2009

Mündliche Prüfung (Disputation) am: 15.01.2010

Druckjahr 2010



---

## Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

S. Harling, A. Schwoerer, K. Scheibe, R. Daniels, H. Menzel, „A new hydrogel drug delivery system based on Hydroxyethylstarch derivatives“, Journal of Microencapsulation, Vorabveröffentlichung online am 03.11.2009

A. Schwoerer, S. Harling, H. Menzel, R. Daniels, „Influence of degree of substitution of HES-HEMA on the release of incorporated drug models from corresponding hydrogels“, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Volume 73, Issue 3.11.2009, Pages 351-356

A. Schwoerer, S. Harling, H. Menzel, R. Daniels, „Release behaviour of hydrogel microparticles based on hydroxyl-ethyl-starch as a drug delivery system for proteins“ Journal of Controlled Release, Volume 132, Issue 3, 18.12.2008, Pages e16-e17, Proceedings of the Tenth European Symposium on Controlled Drug Delivery

S. Harling, E. Heim, A. Schwoerer, F. Ludwig, M. Schilling and H. Menzel, „Hydrogel characterisation: Swelling versus fluxgate magnetorelaxometry“ Journal of Controlled Release Volume 132, Issue 3, 18.12.2008, Pages e68-e69 Proceedings of the Tenth European Symposium on Controlled Drug Delivery

### Tagungsbeiträge

A. Schwoerer, S. Harling, H. Menzel, R. Daniels (2008) „Degradation and release behavior of hydrogels based on hydroxethylstarch „6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, (7.-10. April 2008) Posterbeitrag

S. Harling, A. Schwoerer, E. Heim, F. Ludwig, M. Schilling, H. Menzel (2008) „Characterisation of Hydrogel Drug Delivery Systems by Fluxgate Magnetorelaxometry“, 8th World Biomaterials Congress Amsterdam (NL), 28.05-01.06.2008, Posterbeitrag.

A. Schwoerer, S. Harling, H. Menzel, R. Daniels (2008) „Release behavior of hydrogel microparticles based on hydroxethylstarch as a Drug Delivery System for Proteins“ 10th European Symposium on Controlled Drug Delivery, Noordwijk, Niederlande, (2-4. April 2008) Posterbeitrag

A. Schwoerer, S. Harling, H. Menzel, R. Daniels (2008) „Hydrogels based on Hydroxyethylstarch as a Drug Delivery System for the controlled release of Proteins“, Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Braunschweig, (4-5. März 2008) Posterbeitrag

A. Schwoerer, S. Harling, H. Menzel, R. Daniels (2007) „Hydrogels based on Hydroxyethylstarch as a Drug Delivery System for the controlled release of Proteins“, Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Freiburg i. Br., (22. - 23. März 2007) Vortrag

A. Schwoerer, S. Harling, H. Menzel, R. Daniels (2006) „Hydrogels based on Hydroxyethylstarch as a Drug Delivery System for the controlled release of Proteins“, Polypharma international conference, Halle/Saale (24.-26. September 2006) Posterbeitrag



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Daniels im Sonderforschungsbereich 578 Teilprojekt D1 der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Herrn Prof. Dr. R. Daniels

danke ich herzlich für die Möglichkeit zur Promotion, die Unterstützung während der Bearbeitung, sowie die vielen konstruktiven Gespräche.

Herrn Prof. Dr. H. Menzel danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens, die Anstellung im Institut der Technischen Chemie, sowie für die ausgesprochen hilfreiche Betreuung.

Frau Prof. Dr. Bunjes danke ich für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft nach Übernahme der Teilprojektleitung.

Herrn Prof. Dr. S. Dübel danke ich für die ständige Unterstützung und die sehr freundliche Aufnahme in dem Institut für Biotechnologie und Biochemie.

Herrn Prof. Dr. S. Lang möchte ich für die Integration in die Arbeitsgruppentreffen und die dadurch entstandenen Gespräche danken.

Ein besonderer Dank gilt Steffen Harling für die sehr gute Zusammenarbeit im Teilprojekt, für das Überlassen von HES-HEMA, die Anfertigung von Kryo-REM-Aufnahmen und die vielen netten Gespräche.

Julika Wrenger danke ich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, Freundschaft und die großartige Hilfe bei EDV-Fragen.

Erik Heim des Instituts für Elektrotechnik der TU Braunschweig danke ich sehr für die produktive Mitarbeit an dem Projekt und für die vielen Hilfestellungen bei den Fragen zu den MRX-Untersuchungen.

Sandra Barisch der Pharmazeutischen Technologie der Universität Tübingen möchte ich meinen Dank aussprechen für die gute Zusammenarbeit und die vielen netten und auch konstruktiven Gespräche.

Allen Mitarbeitern der Institute für, Biotechnologie und Biochemie, Pharmazeutische Technologie sowie des Sonderforschungsbereichs 578 danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Christiane Mollenschott vom Helmholtzzentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung bei den Fluoreszenzmessungen.

Klaus Weyhing der Pharmazeutischen Technologie der Universität Tübingen danke ich für die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie-Messungen.

Dr. Robert Hänsch des Instituts für Pflanzenbiologie danke ich für die Unterstützung bei der Konfokallasermikroskopie.

Anne Balck und Monika Michalzik des Instituts für Mikrotechnik danke ich für die Mitarbeit bei der Entwicklung eines mikrofluidischen Systems.

Den Firmen Fresenius Kabi und BASF möchte ich für die großzügige Überlassung von Untersuchungsmaterialien danken.

Stefanie Hofmann danke ich sehr für die kritische Durchsicht meiner Arbeit sowie für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Übernahme dieses Projektes.

Mit besonderem Ausdruck möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Vor allem bei meinen Eltern, die mir die Möglichkeit für meine Ausbildung gegeben haben und mich dabei jederzeit unterstützt und begleitet haben.

Mein allergrößter Dank gilt Christian Karle, für die kritische und hilfreiche Durchsicht meiner Arbeit und seine liebevolle Unterstützung.



## Abkürzungsverzeichnis

ATPS	Aqueous Two Phase System/wässriges Zwei-Phasensystem
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca	Calcium
DEX	Dextran
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Degree of Substitution/Vernetzungsgrad
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HES	Hydroxyethylstärke
HES-HEMA	Hydroxyethylstärke- Hydroxyethylmethacrylat
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin Isotyp A
IgD	Immunglobulin Isotyp D
IgE	Immunglobulin Isotyp E
IgG	Immunglobulin Isotyp G
IgM	Immunglobulin Isotyp M
kDa	Kilodalton
MNP	Magnetische Nanopartikel
MRX	Magnetrelaxometrie
PBS	Phosphate Buffered Saline (Puffer aus Phosphat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid)
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PEG	Polyethylenglykol
PI	Photoinitiator
ppm	Parts per million
rpm	Revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
U	Units (Einheit)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>11</b>
2.1	Hydrogele als Drug Delivery System	11
2.1.1	Definition	11
2.1.2	Eigenschaften	12
2.1.3	Weitere Einsatzbereiche	15
2.2	Zwei-Phasen-Systeme zur Herstellung von Mikropartikeln	16
2.3	Mikropartikel	19
2.4	Antikörper	28
2.4.1	Struktur und Funktion	29
2.4.2	Anforderungen an eine Antikörperformulierung	33
2.5	Lysozym als Modellprotein	34
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
3.1	Material	37
3.1.1	Polyethylenglykol	37
3.1.2	Hydroxyethylstärke	37
3.1.3	Hydroxyethylstärke-Hydroxyethylmethacrylat	38
3.1.4	Irgacure 2959®	39
3.1.5	Chromeon-494-Lysozym	40
3.1.6	Fluorescein-isothiocyanat markiertes Dextran	41
3.1.7	Serum	41
3.1.8	Bovine Serum Albumin (BSA)	41
3.1.9	Anti-BSA	41
3.1.10	Peroxidase konjugiertes Anti-Kaninchen Immunglobulin G	42
3.1.11	Fluorescein-isothiocyanat-Lysozym	42
3.1.12	Natriumazid	42
3.1.13	Alpha-Amylase	42
3.1.14	Magnetische Eisennanoteilchen	43
3.1.15	Pufferlösungen	43
3.1.16	Milli-Q-Wasser	44
3.1.17	Sonstige Materialien	44
3.2	Methoden	44
3.2.1	Herstellen von HES-HEMA Lösungen	44
3.2.2	Herstellung der Mikrosphären	44
3.2.3	Herstellung von Hydrogelzylinder	46
3.2.4	Lichtmikroskopie	46
3.2.5	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	46
3.2.6	Konfokalmikroskopie/Laserrasterelektronenmikroskopie	47
3.2.7	Kryo-REM	47
3.2.8	Partikelgrößenbestimmung	47
3.2.9	In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen der Mikrosphären	48

---

3.2.10	In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen der Gelzylinder .....	48
3.2.11	Abbau in alpha-Amylaselösung .....	48
3.2.12	Fluoreszenzmessung .....	49
3.2.13	ELISA .....	49
3.2.14	Antikörperstabilitätsuntersuchungen .....	50
3.2.15	Dinitrosalicylsäure (DNS) .....	52
3.2.16	Magnetrelaxometrie .....	52
3.2.17	Quellungsmessung .....	61
3.2.18	pH-Wert Bestimmung .....	61
3.2.19	Lagerung und Handhabung von Proteinen und Antikörpern .....	62
3.2.20	Bestimmung des initialen Wassergehaltes .....	62
3.2.21	Viskositätsmessung .....	62
<b>4</b>	<b>Versuchsergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>63</b>
4.1	Mikropartikel Charakterisierung .....	63
4.1.1	Morphologie .....	63
4.1.2	Partikelgrößenverteilung .....	65
4.1.3	Einschlusseffizienz .....	69
4.2	Freisetzung aus Hydrogelen .....	72
4.2.1	Einfluss der Netzwerkdicke .....	72
4.2.2	Vergleich Hydrogelzylinder und Mikrosphären .....	76
4.2.3	Eingeschlossene Testsubstanz mit unterschiedlicher Molekulargröße .....	79
4.2.4	Freisetzung bei Einsatz verschiedener Akzeptormedien .....	89
4.3	Magnetrelaxometriemessungen zur Netzwerkcharakterisierung .....	99
4.3.1	Visueller Abbau der MNP-beladenen Hydrogelzylinder .....	99
4.3.2	Stabilität der Eisennanopartikel .....	101
4.4	Co Immobilisierte alpha-Amylase .....	107
4.4.1	Freisetzung .....	107
4.4.2	Messung der Glucoseäquivalente .....	109
4.5	Antikörperereinschluss in Hydrogele .....	112
4.5.1	Stabilitätsuntersuchungen .....	112
4.5.2	Antikörperfreisetzung .....	120
<b>5</b>	<b>Abschlussdiskussion .....</b>	<b>128</b>
5.1	Netzwerkdicke .....	129
5.2	Antikörper/Proteine .....	131
5.3	Fazit .....	133
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>

# 1 Einleitung

Die dynamische Entwicklung im Bereich der Biotechnologie führt auch zu einer hohen Zahl an neuen pharmazeutisch interessanten Produkten. Zu diesen gehören insbesondere therapeutisch aktive Proteine [1], wie zum Beispiel Antikörper. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften stellt die Anwendung von Proteinen in der Medizin immer noch eine Herausforderung dar. So weisen die meisten Proteine eine geringe Stabilität gegen extreme pH-Werte, viele Lösungsmittel, Scherstress sowie unphysiologische Salzkonzentrationen auf. Parenteral appliziert zeigen sie in der Regel kurze biologische Halbwertszeiten, da sie von körpereigenen Proteasen rasch verstoffwechselt werden. Auch ihre im Vergleich zu anderen Wirkstoffen hohe molekulare Masse erschwert die Applikation [2]. An diese Anforderungen muss ein geeignetes Freisetzungssystem (Drug Delivery System (DDS)) für die therapeutische Anwendung von Proteinen angepasst sein. Die Freisetzung sollte über einen längeren Zeitraum erfolgen, um dadurch gleichmäßige Serum- bzw. Gewebekonzentrationen zu erzeugen. Als viel versprechend gelten Freisetzungssysteme auf Hydrogelbasis, da diese im Vergleich zu anderen Biomaterialien dem menschlichen physiologischen Gewebe in ihrem Wassergehalt und ihrer Konsistenz ähneln und einen schonenden Einschluss der Proteine ermöglichen [3, 4].

Die retardierte Freisetzung von Wirkstoffen aus einem Hydrogel kann über zwei Mechanismen erfolgen: zum einen über den Abbau der Hydrogelmatrix, wodurch eingebettete Substanzen freigelegt werden, zum anderen über Diffusion durch das Hydrogelnetzwerk. Bei vielen Hydrogelen finden beide Mechanismen parallel statt, wobei die Diffusion der eingeschlossenen Substanzen durch die Degradation der Matrix zusätzlich erleichtert wird [5]. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurde ein DDS durch dreidimensionale Vernetzung eines Hydroxyethylstärke-Derivats, der Hydroxyethylmethacrylat-Hydroxyethylstärke (HES-HEMA), hergestellt. Hydroxyethylstärke wird als Plasmaexpander in der Medizin seit vielen Jahren eingesetzt und ist daher für seine physiologische Verträglichkeit bekannt [6]. Die reaktive Seitenkette, die eine Vernetzung der HES-Ketten ermöglicht, besteht aus Hydroxyethylmethacrylat, einer Substanz die bei der Herstellung von Medizinprodukten seit längerem eingesetzt wird. Unter anderem wird sie zum Herstellen von weichen Kontaktlinsen benutzt [7]. Der Einschluss der Proteine erfolgt direkt mit der Ausbildung des Netzwerkes. Die HEMA-Gruppe wird über eine

Carbonatestergruppe an die Hydroxyethylstärke angebunden. Die Vernetzung kann nach Aktivierung über einen Photoinitiator mit weiteren HEMA-Gruppen durch radikalische Polymerisation erfolgen wodurch ein Netzwerk geformt wird. Die in dem Polymer enthaltenen Carbonatesterbindungen sind hydrolyselabil und das HES-Rückgrat über Amylasen abbaubar. Das entstehende Hydrogel ist somit bioabbaubar und lässt eine gute Biokompatibilität erwarten.

Hydrogelmikrosphären lassen sich aus diesem Polymer über einen wässrigen Zwei-Phasenseparationsprozess herstellen. Hierbei wird eine Emulsion aus einer wässrigen HES-HEMA- und einer Polyethylenglykollösung im Konzentrationsbereich der Mischungslücke dieser Polymere hergestellt, wobei die diskontinuierliche Phase derjenigen der HES-HEMA Phase entspricht. In Gegenwart eines Photoinitiators und UV-Licht lassen sich aus den Tröpfchen Mikropartikel formen.

Des Weiteren lassen sich auch makroskopische Hydrogele formen, wie Zylinder mit einem Volumen von 150 µl.

Die Mikropartikel wurden hinsichtlich ihrer Größe, Morphologie, Beladung und Quellungseigenschaften charakterisiert.

Der Einfluss des unterschiedlichen Vernetzungsgrads und der Hydrogelform (Mikrosphäre/Zylinder) auf die Eigenschaften der Hydrogele wurde untersucht. Zur Charakterisierung der Netzwerkbeschaffenheit wurden Substanzen mit unterschiedlicher Molekülgröße eingeschlossen und das dabei resultierende Freisetzungsverhalten verglichen.

Der Einfluss von Akzeptormedien auf die in-vitro Freisetzungsgeschwindigkeit wurde unter Verwendung von Natriumphosphat-Puffer, Natriumcarbonat-Puffer und humanem Serum gezeigt.

Ergänzend wurde untersucht, ob das Herstellungsverfahren der Hydrogele den Anforderungen an die Arbeit mit Proteinen gerecht wird. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper in die Hydrogelpartikel eingeschlossen und mit Hilfe eines Enzym-Linked-Immunosorbent-assay (ELISA) auf ihre Funktionalität hin überprüft.



## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Hydrogele als Drug Delivery System

#### 2.1.1 Definition

Als Hydrogele bezeichnet man Zubereitungen mit hohem Wassergehalt (80-90 %), welche aus makromolekularen organischen Substanzen über begrenzte Quellung hergestellt werden [8]. Die hydrophilen Polymerketten bilden ein dreidimensionales Netzwerk aus, welches in Wasser nicht löslich ist, aber große Mengen Wasser innerhalb seiner Struktur einlagern kann. Durch den hohen Wassergehalt und ihre weiche Konsistenz sind Hydrogele dem natürlichen Gewebe sehr ähnlich. Auf Grund dieser Eigenschaften sind Hydrogele besonders gut biokompatibel [9-11].

Für die pharmazeutische und biomedizinische Anwendung sind Hydrogele auch deswegen interessant, da durch die Wahl des Polymers oder des Herstellungsprozesses, Hydrogele mit verschiedenen physikochemischen, mechanischen und biologischen Eigenschaften hergestellt werden können. Die Eigenschaften des Hydrogels können somit maßgeschneidert an die jeweiligen Anforderungen angepasst werden [11].

Hydrogele lassen sich auf unterschiedliche Weise klassifizieren. Für den pharmazeutischen Gebrauch ist es üblich nach dem Aufbau der Polymere (natürlich, synthetisch) oder nach der Art der Bindung zwischen den Polymeren zu unterscheiden (chemisch und physikalisch).

Abhängig vom Polymer unterscheidet man natürliche oder synthetische Hydrogele. Natürliche Hydrogele entstehen durch Vernetzung natürlicher Polymere wie zum Beispiel Proteine, Polysaccharide, (zum Beispiel Chitosan [12]) und Desoxyribonukleinsäuren (DNS). Hierbei müssen die vorliegenden Vernetzungsmöglichkeiten innerhalb der Polymere ausgenutzt werden, um über physikalische oder chemische Bindungen eine Netzwerkstruktur auszubilden, es können also Hauptvalenz- oder Nebenvalenzgele erhalten werden.

Ein anderer Weg von einem Makromolekül zu einem Netzwerk zu gelangen ist es in synthetisch oder semisynthetisch hergestellten Polymeren vernetzbare Gruppen in das Molekül einzubauen. Hierdurch können auch weitere physikalische oder chemische Eigenschaften erhalten werden. Als Beispiele für pharmazeutisch bekannte synthetische Hydrogele, die über verschiedene Wechselwirkungen Gelbildungseigenschaften haben, sind Poly(meth)acrylsäuren, Poly(meth)acrylate, Polyvinylalkohol [13, 14] oder Blockpolymere aus Polyethylenoxid und Polytetramethylenoxid [15] zu nennen. Ein synthetisches, durch kovalente Quervernetzung von Seitenketten erhaltenes Gel ist das Polyacrylamidgel als Beispiel zu nennen [16]. Als semisynthetisches Polymer ist das Dextran-Hydroxyethylmethacrylat in den Arbeiten von van Dijk-Wolthuis et al. [17, 18] beschrieben. Dieses ist von der Funktionalisierung vergleichbar mit dem in dieser Arbeit verwendeten HES-HEMA. Das Netzwerk wird in diesem Fall über eine chemische Bindung realisiert, weshalb diese zu den Hauptvalenzhydrogelen gehören. Die Zahl der möglichen Vernetzungspunkte zwischen den Polymersträngen ist durch den DS-Wert (Degree of Substitution) gegeben. Dieser errechnet sich aus der Zahl der reaktiven Seitenketten pro Polymereinheit. Bei HES-HEMA beschreibt ein DS von 0,1, dass pro Glucoseeinheit des Polymerrückrates 0,1 HEMA-Moleküle zu erwarten sind, im Durchschnitt hat in diesem Fall jede zehnte Glucoseeinheit einen HEMA-Substituenten.

### **2.1.2 Eigenschaften**

Die Freisetzung von Wirkstoffen oder Testsubstanzen aus Hydrogelen kann durch Quellung, Diffusion und Hydrogelabbau beeinflusst werden [19].

Eine bedeutende Eigenschaft der Hydrogele ist ihr Quellungsverhalten, also ihre Fähigkeit große Mengen Wasser aufzunehmen. Der Anteil des aufgenommenen Wassers lässt sich am einfachsten gravimetrisch bestimmen. Aus den Massengewichten des trockenen beziehungsweise gequollenen Gels lässt sich dann auch die Quellungsrate (SRW) errechnen.

$$SRW = (W_s - W_d) / W_d$$

$W_s$  steht dabei für das Gewicht des gequollenen und  $W_d$  für das Gewicht des trockenen Hydrogels.

Die Quellungseigenschaft der Hydrogele hängt entscheidend von ihrem Aufbau ab, von den Monomeren, dem Vernetzungsgrad sowie den äußeren Bedingungen bei ihrer Herstellung, wie pH-Wert, Temperatur oder Salzkonzentration.

Ein Hydrogel befindet sich in einem ausgeglichenen Zustand, also im Zustand der Gleichgewichtsquellung, wenn die Quellungskraft gleich der Rückstellkraft ist. Die Gleichgewichtsquellungsrate wird neben der Bestimmung des elastischen Moduls für die Berechnung des DS verwendet [20].

Der DS des Netzwerkes hat auch einen Einfluss auf mechanische Eigenschaften und die Permeabilität des Hydrogels. Durch den hohen Wassergehalt sind die meisten Hydrogele mechanisch instabil. Erhöht man den DS der Hydrogele oder stabilisiert man diesen mit Zusätzen wie Silikaten, erreicht man eine erhöhte mechanische Stabilität, die allerdings zu Lasten der Quellungsrate geht [11].

Bei porösen Netzwerken hängt die Diffusion der eingeschlossenen Substanzen von der Maschenweite und der Tortuosität, sowie von der molekularen Größe des diffundierenden Stoffes ab. Die Maschenweite des Netzwerkes kann als Pore betrachtet werden und wird im Weiteren in dieser Arbeit als Porosität betrachtet. Die Ausbildung von Poren kann durch eine Phasenseparation während der Gelbildung entstehen. Durch das Wachsen der Polymergröße bei der Vernetzung wird die Löslichkeitsgrenze überschritten und das Polymergerüst fällt als Gel aus. Die dabei entstehenden Poren sind relativ groß. Feinere Poren, die im gesamten Netzwerk zu finden sind, lassen sich durch den Vernetzungsgrad der Polymerketten erklären [9].

Nach dem Fick'schen-Gesetz ist die Diffusion abhängig vom dem Konzentrationsgefälle und dem Diffusionskoeffizienten. Der Diffusionskoeffizient ist ein Maß für die Beweglichkeit eines Stoffes in seiner Umgebung, beschrieben durch eine in einer bestimmten Zeit zurückgelegte Wegstrecke. Bei einer Diffusion durch eine poröse Wand oder Membran kommt die Abhängigkeit von der Querschnittsfläche und der Größe der Poren dazu (s. Gleichung 3.1) [10, 21].

$$D_{im} = D_{iw} * \left( \frac{\varepsilon K_p}{\tau} \right)$$

Gleichung 3.1

$D_{im}$	Diffusionskoeffizient des gelösten Stoffes durch das Lösungsmittel
$D_{iw}$	Diffusionskoeffizient des gelösten Stoffes durch das Hydrogel
$\varepsilon$	Porosität
$\tau$	Maß für die Tortuosität
$K_p$	Verteilungskoeffizient

Die durchschnittliche Größe der Poren, die Größenverteilung sowie Verbindungen der Poren sind entscheidend für das Quellungs- und Freisetungsverhalten von Hydrogelen. Ebenso beeinflusst die Tortuosität des Netzwerks sowie die Wechselwirkungen der eingeschlossenen Substanz mit dem Polymer die Wirkstofffreigabe, wobei das Ausmaß schwer zu charakterisieren ist. Annäherungsweise lässt sich die Porenstruktur durch den Einschluss von fluoreszenzmarkierten Substanzen mit einer definierten molekularen Größe aufklären [22].

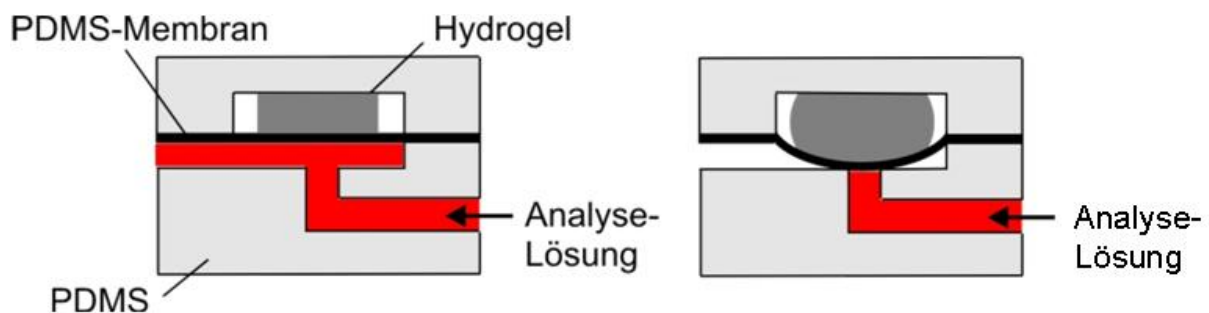
Unter bioabbaubaren Hydrogelen versteht man Gele, die unter physiologischen Bedingungen abgebaut werden. Dieser Abbau kann sowohl über chemische Hydrolyse als auch über enzymatisch katalysierte Hydrolyse erfolgen. Der Vorteil dieser Hydrogele liegt darin, dass sie nach Freisetzen des Wirkstoffes nicht aus dem Körper entfernt werden müssen und dass man die Biodegradation auch zur Steuerung der Freisetzung ausnutzen kann. Ein Beispiel für ein bioabbaubares Hydrogel ist Polylactid-co-Glycolid (PLGA), welches breite Anwendung als DDS findet [23]. Ein DDS auf Basis von PLGA ist allerdings für den Einschluss und die Freisetzung von Peptiden und insbesondere Proteinen nur begrenzt geeignet. Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln bei der Herstellung und ein Absinken des pH-Wertes durch die bei der Degradation entstehende Milchsäure, können zu einem Wirkverlust von Proteinen und Peptiden führen [11]. Diese Nachteile werden bei Hydrogelen auf DEX-HEMA- bzw. HES-HEMA-Basis vermieden [17]. Aus diesen Gelen können aufgrund der großen Poren- bzw. Kanalstrukturen kleine Moleküle rasch durch Diffusion freigesetzt werden (initiale Freisetzung).

### 2.1.3 Weitere Einsatzbereiche

Neben der Nutzung als Drug Delivery System werden Hydrogele noch in anderen Bereichen der Biomedizin eingesetzt.

Hydrogele spielen unter anderem in der Mikrotechnik eine bedeutende Rolle, wo sie in der Lab-on-chip Diagnostik eingesetzt werden [24]. Hydrogele, deren Volumen über verschiedene Einflussfaktoren wie zum Beispiel pH-Wert, Temperatur, Licht oder auch durch Antigene [25, 26] gesteuert werden können, lassen sich als Mikroventile oder Mikrodispensierer einsetzen. Alternativ werden Ventile in der Mikrotechnik elektromagnetisch, piezoelektrisch oder thermopneumatisch geregelt, wobei ein relativ hoher Energieeinsatz nötig ist.

Hydrogelventile haben den großen Vorteil, dass kein externer Stromanschluss erforderlich ist, da es mit ihrer Hilfe möglich ist, chemische Signale direkt in mechanische Arbeit umzusetzen (s. Abbildung 2.1). Ein gut beschriebenes Beispiel für ein Hydrogel mit einem pH-Wert-abhängigen Volumen ist das vernetzte Polyacrylsäure-2-hydroxyethylmethacrylat (pAA-HEMA) [26, 27].



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung eines Hydrogelventils zur Steuerung von Mikroflusssystemen über Volumenänderung, links ungequollen, rechts gequollen, PDMS steht für Polydimethylsiloxan

Hydrogele eignen sich zudem als Gerüststrukturen für Zellen, welche nach Aufbringen auf das Hydrogel Gewebestrukturen ausbilden können und daher bei Gewebs- oder Organverletzungen zur Reparatur eingesetzt werden können. Hierbei ist der hydrophile und damit zellfreundliche Charakter der Hydrogele wieder entscheidend für dieses Einsatzgebiet [9].

Die Hydrogele müssen hierzu entweder Poren aufweisen die groß genug sind, um lebende Zellen einschließen zu können oder sie müssen so gestaltet sein, dass sie abbaubar sind, so dass Zellen beim Vermehren in das Gel penetrieren können. Zusätzlich können in den Hydrogelen Wachstumsfaktoren eingeschlossen sein. Geeignet für die Gewebezüchtung sind zum Beispiel Hydrogele auf Hyaluronsäure-, Collagen- oder PEG-Basis [28-30]. Nachteilig für die Verwendung der Hydrogele in diesem Einsatzgebiet ist ihre geringe mechanische Stabilität und Schwierigkeiten bei der Sterilisation [9].

## **2.2 Zwei-Phasen-Systeme zur Herstellung von Mikropartikeln**

Das Phänomen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems ist zuerst beim Mischen von wässrigen Agar- und Gelatinelösungen bzw. Gelatine- und Stärkelösung 1896 von Beijnerick beschrieben worden [31]. Per Ake Albertsson nutzte Mitte der 1950er Jahre wässrige Zwei-Phasen-Systeme zur schonenden Trennung von Makromolekülen, Zellen und Zellorganellen [32]. Zur Herstellung von Mikropartikeln bestehend aus DEX-HEMA und Polyethylenglykol wurde das ATPS (Aqueous two phase system) zuerst von der Arbeitsgruppe um Hennink eingesetzt [33].

Verschiedene Kombinationen von Polymeren sind für das Ausbilden eines ATPS bekannt (s. Tabelle 2.1) [34-38]. Zusätzlich weisen Derivate dieser Makromoleküle, wie DEX-HEMA und HES-HEMA, die gleichen Separationseigenschaften auf.

**Tabelle 2.1 : Bekannte Polymerkombination zur Ausbildung von wässrigen Zwei Phasen Systeme (nach Albertsson et al.; Hennink et al., Scheibe et al., Tjerneld et al.)**

<b>Polymer 1</b>	<b>Polymer 2</b>
Propylenglykol	Polyethylenglykol
Propylenglykol	Polyvinylalkohol
Propylenglykol	Polyvinylpyrrolidon
Propylenglykol	Hydroxypropyldextran
Propylenglykol	Dextran
Polyethylenglykol	Hydroxypropylstärke
Polyethylenglykol	Ficoll (synth. Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin)
Polyethylenglykol	Polyvinylalkohol
Polyethylenglykol	Hydroxyethylstärke
Polyvinylalkohol	Hydroxypropyldextran
Polyvinylalkohol	Methylcellulose
Dextran	Polyethylenglykol
Dextran	Ficoll
Dextran	Polyvinylalkohol
Dextran	Hydroxypropylstärke

Ob ein Zwei-Phasen-System ausgebildet wird, hängt von der molekularen Größe der Polymere und ihrer Konzentration ab.

Die auch als Koazervation beschriebene Entmischung stark solvatisierter Kolloide in zwei flüssige von einander abgegrenzte Phasen, kann bei verschiedenen Systemen entstehen. Eine der beiden Phasen ist in der Regel mit Polymer angereichert, wobei das Polymer in einer dicht zusammengedrängten Form vorliegt. Die Kolloide büßen teilweise ihre Hydrathülle ein, wobei eine sehr dichte Packung mit einem flüssigen Aggregatzustand entsteht.

Im Gegensatz zur einfachen Koazervation, in der die Phasentrennung durch Aussalzen, Temperatur-, pH-Wertänderung oder Alkoholzusatz entsteht, handelt es sich beim Vorliegen von mehreren Polymeren um eine komplexe Koazervation.

Die komplexe Koazervation tritt unter anderem auf wenn zwei unterschiedlich geladene Polymere zusammengegeben werden und es unter Ladungsausgleich zur Abscheidung kommt [8, 39, 40]. Beim Auftreten einer Entmischung von zwei ungeladenen Makromoleküllösungen handelt es sich um ein thermodynamisches Phänomen. Da es sich beim Ausbilden eines ATPS aus HES-HEMA und PEG auch um zwei ungeladenen Polymere handelt, kann die Thermodynamik zur Erklärung herangezogen wird.

Die Ausbildung eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems lässt sich zum Teil mit Hilfe der Gibbsschen-Mischungsenergie erklären [41]. Eine Trennung der beiden wässrigen Phasen tritt auf, da die geringe molare Konzentration der Polymere in Lösung zu einem geringen Entropiezuwachs beim Mischen der beiden Polymere führt [42].

Im Vergleich zu Molekülen mit geringer Molekulargröße, besitzen Polymere eine große Oberfläche, so dass Interaktionen zwischen den Polymerketten auftreten, was generell energetisch ungünstig ist. Die Mischungsentropie wird in einem ternären System aus zwei Polymeren und Lösungsmittel im Gegensatz zu der eines reinen Polymer- Lösungsmittelsystem schwach positiv. Die Gibbs-Mischungsenergie wird positiv, da der resultierende negative Entropieterm der Gibbs-Helmholtz-Gleichung den meist positiven Enthalpieterm kompensieren kann (s. Gleichung 3.2). Dies äußert sich darin, dass die Polymere nicht mischbar sind.

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad \Delta G_m > 0 \quad \text{Gleichung 3.2}$$

$\Delta G_m$ : freie Mischungsenthalpie

T: absolute Temperatur

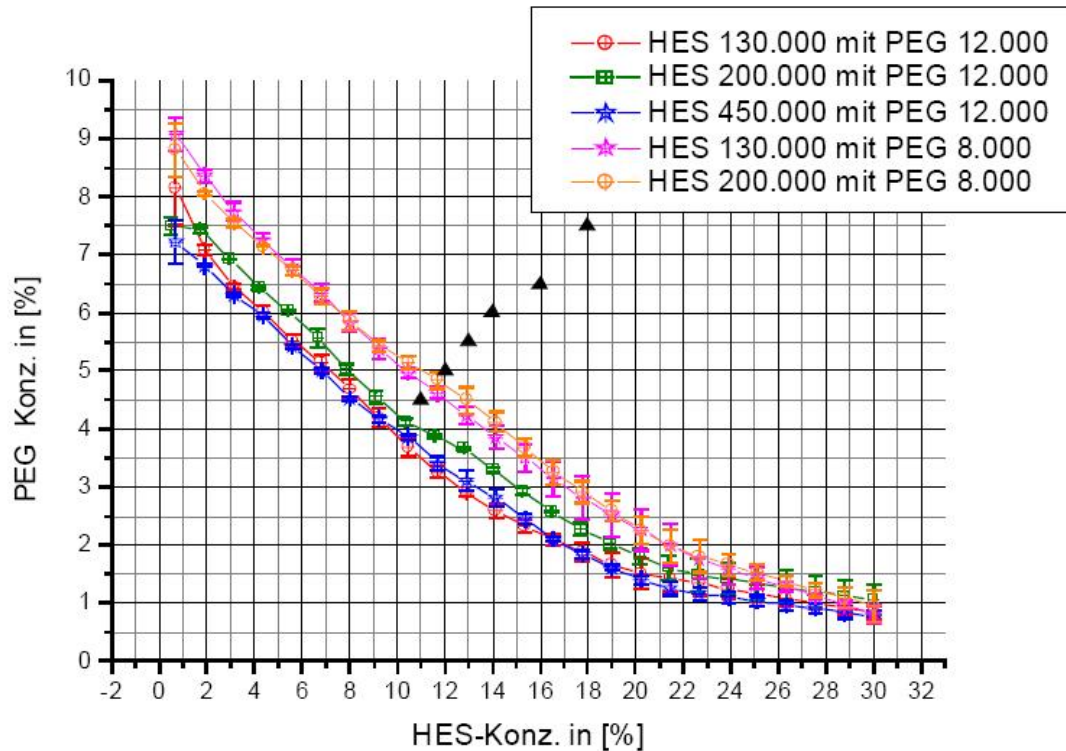
$\Delta S_m$ : Mischungsentropie

$\Delta H_m$ : Mischungsenergie.

Weitere Informationen erhält man über die Gleichung nach Flory, in welche die Länge der Polymere und deren Interaktionsenergie zwischen den Polymeren mit einfließt [41].



Das System bestehend aus HES-HEMA und PEG 12.000 ist in einem Konzentrationsverhältnis von 1,2 / 13 besonders stabil und damit gut geeignet zur Herstellung von Mikropartikeln [36].



**Abbildung 2.2:** Phasendiagramm für die Systeme HES 200.000 / PEG 8.000 bzw. PEG 12.000 und die Systeme HES 130.000 / PEG 8.000 bzw. PEG 12.000 in Natriumphosphat-Puffer bei Raumtemperatur (Grafik von K. Scheibe 2004)

## 2.3 Mikropartikel

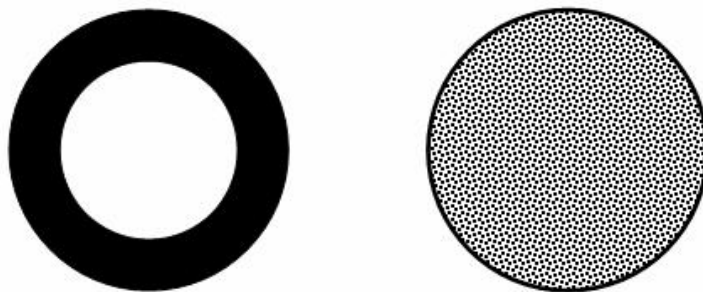
Mikropartikel sind ihrer Definition nach feste und annähernd runde Partikel in einem Größenbereich von 1 bis 1000  $\mu\text{m}$  [43], im engeren Sinn versteht man darunter meist Teilchen die  $< 250 \mu\text{m}$  sind. Die Partikel können aus synthetischen, semisynthetischen oder natürlichen Polymeren bestehen und müssen für den pharmazeutischen Einsatz biokompatibel und möglichst bioabbaubar sein. Zu den semisynthetischen Polymeren, die zur Herstellung von Mikropartikeln geeignet sind, gehören Polysaccharide (z.B. Stärkederivate oder modifizierte Dextrane), Gummen, Proteine und Wachse. Albumin und Gelatine sind natürliche Produkte zur

Mikropartikelherstellung. Zu den geeigneten synthetischen Polymere zählen Polymilchsäure und Polyglycolsäure [14, 44-49].

Charakteristisch für Mikropartikel ist ihr großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis.

Bei Mikropartikeln unterscheidet man Mikrokapseln und Mikrosphären (s. Abbildung 2.3). Mikrokapseln sind aus einem Kern und einer Umhüllung aus einem anderen Material aufgebaut. Der Kern kann dabei fest, flüssig oder sogar gasförmig sein [50, 51].

Von Mikrosphären spricht man, wenn eine durchgängige Gerüstsubstanz besteht in der andere Stoffe mehr oder weniger gleichmäßig eingearbeitet sein können, es handelt sich dabei um Matrixsysteme [43].



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung einer Mikrokapsel bestehend aus einem umhüllten Wirkstoffkern (links) und einer Mikrosphäre (rechts), der Wirkstoff ist mehr oder weniger gleichmäßig in der Polymermatrix eingebettet ohne ausgebildete Kapselwand**

Bereits seit 1930 wurde die Herstellung von Mikropartikeln durch Bungenberg de Jong et al. beschrieben [52]. Kommerziell angewendet wurden farbstoffbeladene Mikrokapseln erstmals in Form von kohlefreien Durchschlagpapier [43].

In der Pharmazie und Medizin werden Mikropartikel für unterschiedlichste Anwendungen eingesetzt. Auf dem Markt existieren Zubereitungen für die orale, inhalative und parenterale Applikation [51, 53, 54] (s. Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2: Auf dem Markt erhältliche Mikropartikelzubereitungen**

<b>Handelsname</b>	<b>Form</b>	<b>Polymer</b>	<b>Verabreichung</b>	<b>Wirkstoff</b>
Decapeptyl- Depot	Mikropartikel	PLGA 50:50	parenteral	Triptorelin
Parlodel LA	Mikropartikel	PLA	parenteral	Bromocriptin
Parlodel LAR	Mikropartikel	Glu-PLGA	parenteral	Bromocriptin
Enantone- Depot	Mikropartikel	PLGA 75:25	parenteral	Leuprorelin
Exubera*	Mikropartikel	Protein	inhalativ	Insulin

\* seit 2007 nicht mehr auf dem Markt

Zellen oder Enzyme werden bei biotechnologischen Prozessen in Alginatpartikel eingeschlossen, um diese von Fermentationsüberständen einfacher abtrennen und gegebenenfalls wieder verwenden zu können. Auch eine Stabilisierung von Zellen oder Enzymen kann durch einen Einschluss in Mikropartikeln erreicht werden, was deren Einsatz für die Zellkultur interessant macht [55].

Die Herstellungsmethoden für Mikropartikel sind zahlreich (s. Tabelle 2.3) und entscheiden mit über die Eigenschaften der Partikel [43].

Tabelle 2.3: Herstellungsverfahren und Materialien zur Mikropartikelproduktion

Herstellungs- methode	Material	Beispiele	Mikro- sphäre	Mikro- kapsel
Wachsummantelung	Wachs	Bienenwachs		X
Heißschmelz- verfahren	Polyanhydride	Polyhydroxy- methacrylate	X	
Sprühbeschichtung	Wasserlösliche Polymere oder wässrige Dispersionen von wasserunlöslichen Polymeren	Polyhydroxy- methacrylate/ Ethylcellulose		X
Sprühtrocknung	Wässrige und nichtwässrige Polymerlösungen	Polymilch- säure	X	X
Fällung	pH sensitive Polymere Ca <sup>2+</sup> Fällung Vernetzbare Polymere	Chitosan Alginate DEX-HEMA HES-HEMA	X	X
Koazervation	Makromoleküle	Carboxymethyl- cellulose		X
Gefriertrocknung	Polymere	Polyhydroxy- methacrylate/ Ethylcellulose	X	X

Wichtig für die Charakterisierung von Mikropartikeln ist ihre Partikelgrößenverteilung. Durch diese bekommt man auch Aufschluss über ihr Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Weitere Möglichkeiten die Qualität von Mikropartikel zu charakterisieren betreffen die Oberflächenbeschaffenheit, die Aufnahme von Wasser, ihre Stoffbeladung, die Oberflächenladung, ihr Benetzungsverhalten sowie ihr Freisetzungsverhalten.

Die Freisetzung aus Mikropartikeln ist abhängig von der Struktur des Polymers und des Wirkstoffes. Die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel bzw. die Porosität, der Partikelmatrix, die Partikelgrößenverteilung und die Degradationsneigung beeinflussen die Wirkstofffreisetzung stark. Wird ein Wirkstoff allein durch Diffusion freigesetzt, so ist dieser im Polymernetzwerk frei beweglich, die Poren der Netzwerkstruktur sind größer als der hydrodynamische Durchmesser der eingeschlossenen Substanz. Ist dies der Fall, ist die Geschwindigkeit der Freisetzung abhängig von der Oberfläche, der Diffusionsstrecke und der Wirkstoffkonzentration [56, 57].

Zerfällt die Mikrosphärenmatrix während der Wirkstofffreisetzung verändert sich auch die Diffusionseigenschaft. Die Diffusionsstrecke verkürzt sich und durch Aufbrechen von Vernetzungspunkten der Matrix werden die Poren größer, wodurch Diffusion auch von Wirkstoffmolekülen aus stärker vernetzten Bereichen möglich ist bzw. größere Moleküle freigesetzt werden können [43].

Um die Freisetzung mathematisch zu charakterisieren, gibt es verschiedene Modellrechnungen.

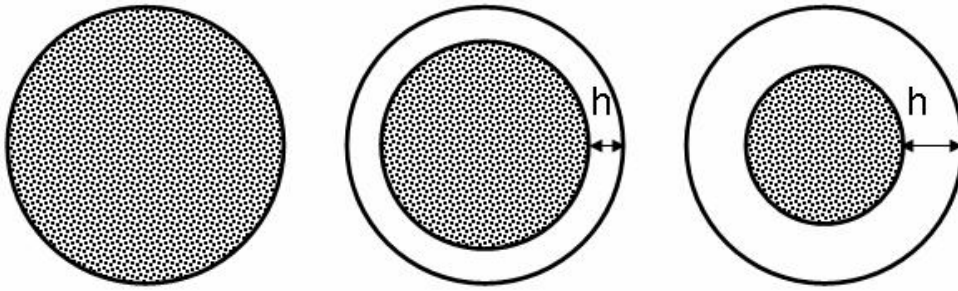
Das Quadratwurzelgesetz nach Higuchi wurde 1961 entwickelt, um die Wirkstofffreisetzung aus Salbengrundlagen zu beschreiben. Es ist anwendbar auf Systeme, in denen ein gelöster Wirkstoff über Fick'schen-Diffusionstransport aus einer unlöslichen, porenhaltigen Matrix freigesetzt wird [58-61].

Demnach verhält sich der Stofftransport proportional zur Wurzel der Zeit (s. Gleichung 3.3). Der Diffusionskoeffizient kann rechnerisch aus der Steigung des Graphen nach Auftragung der freigesetzten Wirkstoffmenge gegen die Wurzel der Zeit ermittelt werden.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \sqrt{D \cdot C_s \cdot \frac{\varepsilon}{\tau} \cdot (2C_D - \varepsilon \cdot C_s) \cdot t} = k_H \cdot \sqrt{t} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

$M_t$	freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt $t$
$M_\infty$	freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt $t = \infty$
$D$	Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs im Medium
$C_s$	Sättigungslöslichkeit des Arzneistoffs in der Matrix
$\varepsilon$	Porosität
$\tau$	Krümmung der Poren
$C_D$	Gehalt an Arzneistoff in der Matrix
$t$	Zeit
$k_H$	rezepturabhängige Proportionalitätskonstante

Während des Diffusionsvorganges von gelösten Wirkstoffmolekülen aus einer Matrix (in dem Fall eines Mikropartikels) in die Umgebung, verändert sich die Diffusionsstrecke  $h$  während der Zeit, da der Wirkstoff von den äußeren Bereichen des Partikels als erstes abgegeben wird (s. Abbildung 2.4). Da das Konzentrationsgefälle zwischen Wirkstofffront und Medium konstant bleibt, gilt auch bei fortgeschrittener Freisetzung das Fick'sche-Gesetz. Im Verlauf der Freisetzung sinkt der Konzentrationsgradient  $\Delta C/h$  aufgrund der Zunahme der Diffusionsstrecke, wodurch die Freisetzungsgeschwindigkeit absinkt.



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung des Diffusionsprozesses eines Wirkstoffes aus einem Partikel an die Umgebung

Das Freisetzungsgesetz nach Higuchi gilt nur für Systeme, in denen der Wirkstoff im Freisetzungssystem dispergiert vorliegt, also wenn die Konzentration des Wirkstoffes im Freisetzungssystem deutlich größer ist als die Sättigungskonzentration. Bei abnehmender Wirkstoffkonzentration kann die Sättigungslöslichkeit unterschritten werden, wodurch die Gültigkeit für dieses Gesetz nicht mehr gegeben ist. Definitionsgemäß endet die Gültigkeit ab einer Freisetzung von 60 % des Wirkstoffes.

An der Oberfläche anhaftender Wirkstoff, der bei Suspension des Freisetzungssystems im Akzeptormedium abgelöst wird, äußert sich in einer hohen initialen Freisetzung und fällt nicht in den Gültigkeitsbereich des Higuchi-Gesetzes.

Eine weitere Limitation für das Quadratwurzelgesetz ist, dass Quellungs- und Erosionsprozesse nicht berücksichtigt werden.

Einen größeren Bereich deckt daher das Potenzgesetz nach Peppas ab, welches Auskünfte über einen Freisetzungsmechanismus durch Diffusion und Degradation gibt (s. Gleichung 3.4) [10, 62].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$$

Gleichung 3.4

$$\lg \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = \lg k + n \cdot \lg t$$

$M_t$	freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt $t$
$M_\infty$	freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt $t = \infty$
$t$	Zeit
$k$	rezepturabhängige Proportionalitätskonstante
$n$	Diffusionsexponent

Durch doppeltlogarithmische Darstellung des freigesetzten Wirkstoffanteils gegen die Zeit erhält man nach diesem Gesetz den Diffusionsexponenten in der Steigung der resultierenden Geraden.

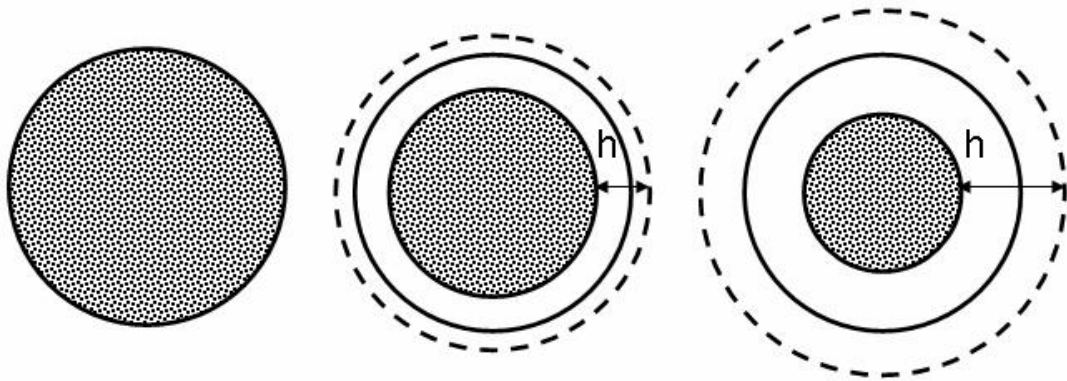
Die Freisetzung aus Hydrogelmikropartikeln erfolgt in der Regel aus einem Zusammenspiel von Diffusions- und Degradationsvorgängen.

Werden lyophilisierte Hydrogelpartikel in das Akzeptormedium gegeben beginnt das Eindringen von Medium in die Hydrogelmatrix. Das Hydrogel wird von außen hydratisiert und ein relativ schnelles Herauslösen von Wirkstoff aus der Oberfläche beginnt. An der Grenzfläche zwischen Hydrogelpartikel und wässrigem Medium bildet sich eine Gelbarriere aus, die den Kontakt zwischen eingeschlossenen Wirkstoff und Lösungsmittel behindert. Bei ausreichender Inkubation des Partikels im Akzeptormedium ist der Partikel über das gesamte Volumen durchfeuchtet und es bildet sich eine gequollene Matrix aus. Die Freisetzung ist diffusionskontrolliert [39] und vom Eintritt der Flüssigkeit als auch von der Diffusionsgeschwindigkeit des Wirkstoffes abhängig.

Je nachdem ob die Polymer-Relaxation (Quellung) oder Diffusionsrate des Wirkstoffes überwiegt, spricht man von Case-I-Transport (Fick'sche-Diffusion) oder Case-II-Transport (quellungsorientierte Wirkstofffreisetzung) [63].

Während der Wirkstofffreisetzung aus den gequollenen Schichten tritt das oben genannte Phänomen des zurückweichenden Wirkstoffreservoirs auf. Dadurch und durch die Quellung wird die Diffusionsstrecke vergrößert (s. Abbildung 2.5) [40].





**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Diffusionsprozesses eines Wirkstoffes aus einem quellbaren Partikel an die Umgebung**

Je nach Geometrie des Freisetzungssystems (flache Scheibe, Zylinder, Mikropartikel) und Eigenschaften des Systems (Quellungseigenschaften) kann die Größe des Diffusionsexponenten Aufschluss auf die überwiegende Freisetzungsform geben [63-65]. Für polydispers verteilte quellbare Hydrogelpartikel liegen die Richtwerte für den Exponenten zwischen  $0,30 \pm 0,01$  und  $0,45 \pm 0,02$ . Bei einem Diffusionsexponent von  $0,30$  handelt es sich um einen reinen Fick'schen-Diffusionsvorgang, bei  $0,45$  liegt ein Case-II-Transport vor, liegt der Diffusionsexponent zwischen  $0,30 < n < 0,45$  wird über beide Mechanismen freigesetzt [63]. Case-II-Transport ist nach Dijk-Wolthuis et al. mit einer Erosion der Matrix gleichzusetzen [66].

Für quellbare, polydisperse, sphärische Freisetzungssysteme ist durch Ritger et al. eine mathematische Beschreibung der Freisetzungskinetik entwickelt worden (s. Gleichung 3.5), in der die Summe von mehreren Gewichtsfraktionen eines bestimmten Radius  $a_i$  einbezogen wurde. Die Addition von Gewichtsfraktionen ist eine Annäherung an die tatsächlichen Größenverhältnisse der Probe, da die Partikelgrößenverteilung eine kontinuierliche Funktion darstellt [63].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_i \omega(a_i) \left( 1 - \frac{k_0}{C_0 a_i} t \right)^3 \quad \text{Gleichung 3.5}$$

$M_t$	freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt $t$
$M_\infty$	freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt $t = \infty$
$t$	Zeit
$k$	rezepturabhängige Proportionalitätskonstante
$\omega(a_i)$	Gewichtsfraction der Mikrosphären mit dem Radius $a_i$
$a_i$	Radius der Mikrosphären
$C_0$	Wirkstoffkonzentration

Der Anwendungsbereich des Potenzgesetzes nach Peppas ist auf die ersten 60 % der Freisetzung beschränkt [64]. Dabei ist darauf zu achten, dass eine ausreichende Anzahl an Messpunkten bis zur Freisetzung von 60 % des Gesamtwirkstoffanteils zur Verfügung steht. Die Anwendbarkeit dieses Gesetzes ist beschränkt auf Partikel, die moderat quellen, das heißt, dass sie durch Quellung nicht mehr als 25 % des ursprünglichen Volumens zunehmen.

## 2.4 Antikörper

Der therapeutische Einsatz von Proteinen gewinnt in vielen Bereichen der Medizin immer mehr an Bedeutung. Durch den zunehmenden Einsatz von Antikörpern in der Therapie wird von einer neuen Ära im Bereich der Proteinpharmazeutika gesprochen [67]. Im Allgemeinen sind Proteinpharmazeutika wegen ihrer hohen Spezifität bereits in geringen Dosierungen aktiv und zeigen in den meisten Fällen eine sehr gute Verträglichkeit im Vergleich zu niedermolekularen Wirkstoffen. Treten Nebenwirkungen auf, sind diese jedoch oft gravierend [68], weshalb die Forschung und Entwicklung auf diesem Gebiet auch eine enorme Aufmerksamkeit genießt. Bei vielen schweren, teilweise lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Krebs, Infektions- und Autoimmunkrankheiten, Allergien und Entzündungen werden Antikörper immer häufiger mit gutem Erfolg eingesetzt [69]. Der erste kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper (monoclonal antibody MAb), war der 1986 zugelassene

OKT3 (muronomab, orthoclone) [67], welcher auch heute noch als Immunsuppressivum eingesetzt wird [70]. Durch die Erfolge in der Gentechnik gab es in der Zeit zwischen 1985-1995 eine enorme Entwicklung von therapeutischen Antikörpern [69]. Sie sind auf Grund ihrer spezifischen Wirkungsweise besonders effektiv und verringern das Auftreten systemischer Nebenwirkungen. Antikörper können im Sinne eines Drug Targeting an sie gebundene Wirkstoffe zielgerichtet an das zu behandelnde Gewebe steuern. So können unter anderem Oberflächen von wirkstoffbeladenen Liposomen mit Antikörpern auf bestimmte Gewebetypen oder Proteine (z.B.: HER-2) zielgerichtet werden [71].

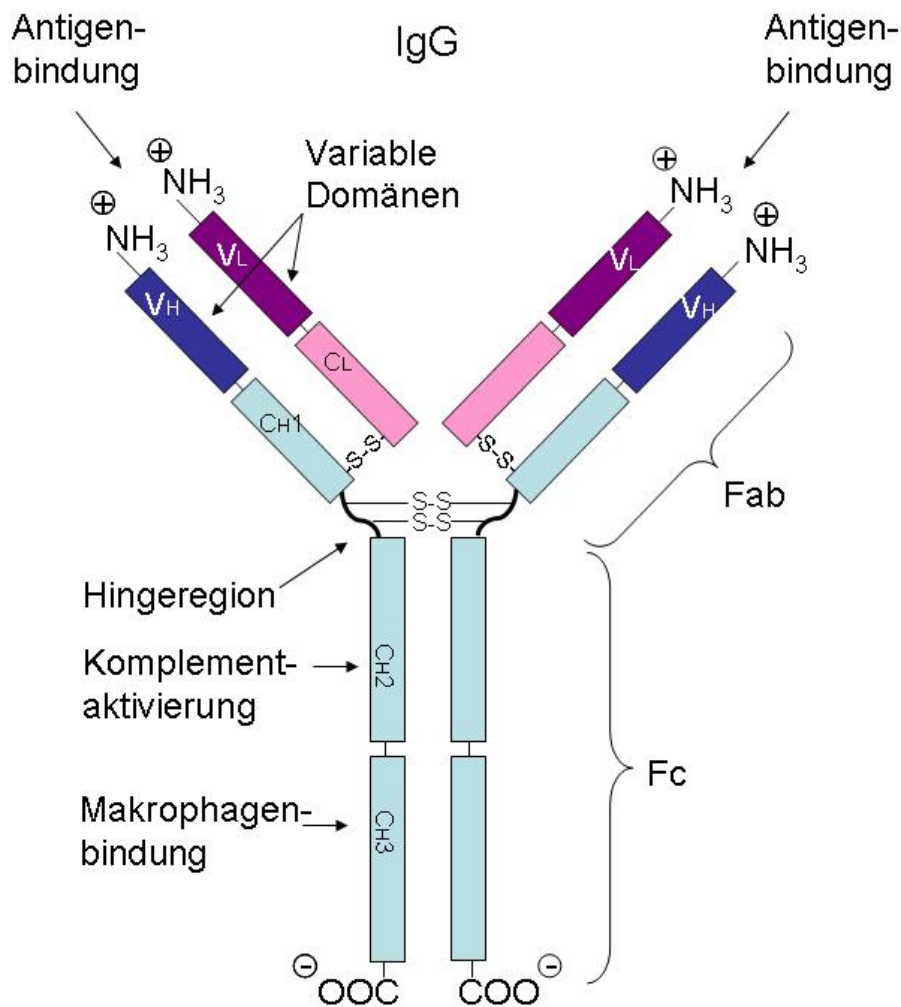
Die Entwicklung eines therapeutischen Antikörpers zu einem marktreifen Arzneimittel ist kompliziert, da das gesamte Wirkprofil nur schwer vorhersehbar ist und die Substanzen meist nur eine geringe Stabilität besitzen [67]. Zur Verbesserung der Stabilität wird an geeigneten Arzneiformen geforscht, welche die Antikörper zunächst schützen und danach freisetzen können. Die derzeit von der FDA zugelassenen monoklonalen Antikörper gehören hauptsächlich (18 von 23) zur Gruppe der Immunglobuline G (IgG). Des Weiteren sind ein IgM-Antikörper und vier in Säugerzellen exprimierte Fab-Antikörper (s. Kapitel 2.4.1) auf dem Markt [72].

### **2.4.1 Struktur und Funktion**

Die Hauptaufgabe des Immunsystems besteht im Schutz des Lebewesens vor eingedrungenen pathogenen Mikroorganismen oder Toxinen (Antigene).

Das Immunsystem der höheren Vertebraten (ab der Überklasse der Gnathostomata) verfügt über ein über das angeborene unspezifische Immunsystem mit dem Komplementsystem, welches z.B. durch makrophagen-vermittelte Phagozytose Pathogene unschädlich machen kann. Zum anderen besitzen sie ein adaptives Immunsystem. Dieses bekämpft Krankheitserreger spezifisch mit Hilfe von Effektorzellen, z.B. den B- und T-Lymphozyten. Die adaptive Immunantwort ist hochspezifisch und stellt einen lang anhaltenden Schutz dar. Ein wichtiger Teil des adaptiven Immunsystems sind die Antikörper, auch Immunglobuline genannt, welche bei einer Immunantwort von den B-Plasma-Lymphozyten sezerniert werden. Diese erkennen und binden Antigene und lösen dadurch eine Aktivierung weiterer Moleküle oder Zellen des Immunsystems aus. Die auf die Markierung folgende Immunantwort hängt von der Antikörperklasse ab. Es kann eine Opsonierung, die Neutralisierung der Antigene, die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Aktivierung von

anderen Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel NK-Zellen und Makrophagen folgen. Die Antikörper lassen sich in fünf Isotypen (Antikörperklassen) unterteilen: IgG, IgA, IgD, IgE und IgM. Diese Isotypen unterscheiden sich in ihrer Struktur und Funktion. Im humanen Serum zählen 80% der Antikörper zu dem IgG Isotyp, ein Polypeptid mit einer molaren Masse von ca. 150 kDa und weisen annähernd eine Y-Form auf. Diese Oligomere bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (HC) (ca. 50 kDa) und zwei identischen leichten Ketten (LC) (ca. 25 kDa), welche über Disulfidbrücken und nicht kovalente Wechselwirkungen miteinander verknüpft sind [73]. Eine IgG-Struktur lässt sich zusätzlich in zwei Domänen unterteilen, die variable Region an den N Termini (V), da sich Teile dieser Sequenz von Antikörper zu Antikörper stark unterscheiden können, und die konstante Domäne (C). Die variable Domäne besitzt die Antigenbindungsstellen, während die konstante Domäne mit den Effektorzellen und -molekülen interagieren kann. Für diese Interaktion befinden sich essentielle Glykosylierungsmuster am C-Terminus der schweren Ketten. Die konstante Domäne der schweren Kette lässt sich in drei Untereinheiten unterteilen,  $C_H1$ ,  $C_H2$  und  $C_H3$ , die jeweils eine Größe von etwa 12 kDa haben. Die  $C_H1$ -Domäne ist mit der  $C_H2$ - und  $C_H3$ -Domäne über die Hingeregion verknüpft. Diese Bindungsregion zeichnet sich durch eine hohe räumliche Flexibilität aus. Im Bereich der  $C_H2$  Region sind die beiden schweren Ketten über zwei Disulfidbrücken verbunden, während in Höhe der  $C_H3$ -Domäne Bereiche hydrophobe Wechselwirkungen für Stabilität zwischen den Ketten sorgen [73].

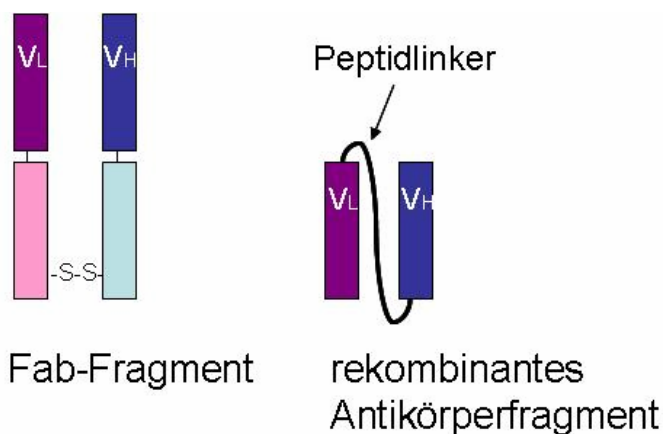


**Abbildung 2.6: Schematische Struktur eines IgG-Moleküls mit Beschreibung der Regionen:**  
 $\text{V}_\text{H}$  variable Region der schweren Kette,  $\text{V}_\text{L}$  variable Region der leichten Kette;  $\text{C}_\text{H1}$ ,  $\text{C}_\text{H2}$ ,  $\text{C}_\text{H3}$  konstante Region und  $\text{C}_\text{L}$  konstante Domäne der leichten Kette; S-S Disulfidbrücken;  $\text{COO}^-$  Carboxylatstruktur;  $\text{NH}_3^+$  primäres protoniertes Amin (Abbildung modifiziert nach Dübel 2007 [69])

In Arbeiten, in denen die Antigenbindungsfunktion untersucht wird, nicht aber die Vermittlung von Effektorfunktionen, können statt der ganzen IgG-Moleküle auch Fragmente eingesetzt werden (s. Abbildung 2.7). Ein Vorteil der Fragmente liegt darin, dass sie besser in Gewebe, wie zum Beispiel Tumorgewebe, eindringen können [74]. In der Regel weisen kleinere Fragmente auch eine schnellere systemische Clearance auf, was bei einigen Antikörpertherapien wünschenswert ist.

Kleinere Fragmente kann man auf zwei verschiedenen Wegen herstellen: zum einen lassen sich IgG mit den Enzymen Papain oder Pepsin in Fragmente spalten, wobei Papain oberhalb und Pepsin unterhalb der Disulfidbrücken beider Ketten spaltet [75]. Die resultierenden Bruchstücke mit der antigenbindenden Domäne werden Fab-Fragmente genannt.

Eine andere Methode hat zusammen mit den Fortschritten in der Gentechnologie an Bedeutung gewonnen: die Herstellung von rekombinanten Antikörperfragmenten in prokaryotischen (z.B.: E. coli) oder eukaryotischen Expressionssystemen [76]. Mit dieser Methode lassen sich sowohl Fab-Fragmente als auch noch kleinere Fragmente herstellen. Diese kleineren Fragmente, auch single chain Fv genannt besitzen eine molekulare Größe von 25 – 30 kDa und bestehen lediglich aus den variablen Bereichen der leichten und der schweren Kette [69].



**Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines Fab-Fragmentes und eines rekombinanten Antikörperfragments; VL variable Region der leichten Kette; VH variable Region der schweren Kette; S-S steht für Disulfidbrücke (Abbildung modifiziert nach Dübel [69])**

### 2.4.2 Anforderungen an eine Antikörperformulierung

Aufgrund der vielen Disulfidbrücken und der nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen ihren Domänen sind Antikörper im Vergleich zu anderen Peptidtherapeutika relativ stabil und halten moderate Temperaturerhöhungen aus. Dennoch treten bei Antikörpern zahlreiche physikalische und chemische Instabilitäten auf, unter anderem Denaturierung, Aggregation, Oberflächenadsorption, Deamidierung, Oxidation, Isomerisierung und Fragmentation. Das Ausmaß der Instabilitäten ist jedoch nicht bei jedem Antikörper vorhersehbar, da die Unterschiede in der Primärstruktur signifikant sein können. Je nach Antikörper muss abgeschätzt werden, welche Formulierung am besten die Stabilität erhält. So gibt es Zubereitungen, welche zusammen mit geeigneten Kryoprotektoren lyophilisiert vorliegen, andere sind als flüssige Zubereitung mit optimal eingestellten pH-Wert und Salzkonzentrationen stabil. Um Aggregationen zu vermeiden, können oberflächenaktive Substanzen beigemischt werden [77-82].

Auch ein geeignetes Freisetzungssystem kann für die Antikörperstabilität von Vorteil sein und eine verlängerte Wirksamkeit bewirken, wenn der Antikörper im Inneren des Freisetzungssystems z.B. vor dem Abbau durch körpereigene Proteasen geschützt ist. Auf dem Gebiet der retardierten Antikörperfreisetzung ist im Gegensatz zu Freisetzungsuntersuchungen mit anderen therapeutischen Proteinen bisher vergleichsweise wenig veröffentlicht. Ein Grund hierfür ist sicherlich die relativ lange biologische Halbwertszeit der Antikörper, die eine retardierte Freisetzung erst ab einer Freisetzungszeit von mehr als einer Woche interessant macht. In den Arbeiten von Homayoun et al. wurde ein Freisetzungssystem auf PLGA-Basis untersucht und eine Freisetzung des anti-cocain catalytic Antikörpers von bis zu 10 Tagen erreicht [83].

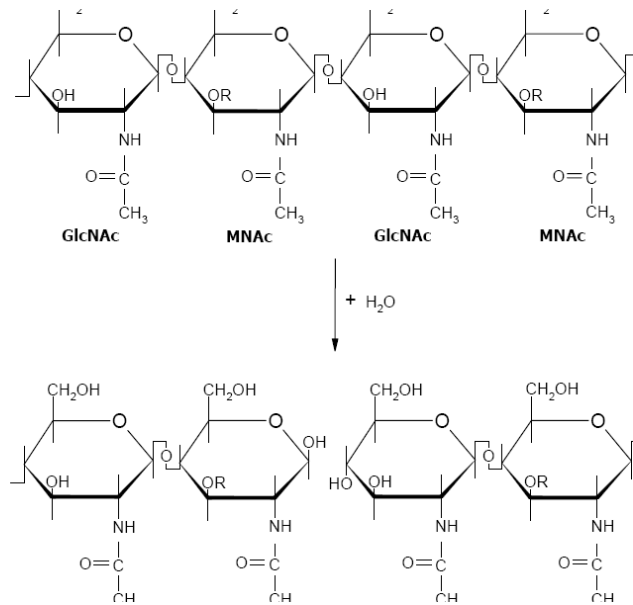
Eine weitere Herausforderung bei der Herstellung eines DDS für Antikörper, liegt in der hohen therapeutischen Dosis eines Antikörpers (mg-Bereich) [67]. Das Freisetzungssystem muss also nicht nur die Antikörpermenge aufnehmen können, sondern diese auch in ausreichender, aber nicht zu hoher Dosis wieder abgeben, wobei die Gefahr von Dose dumpings sicher vermieden werden muss.

## 2.5 Lysozym als Modellprotein

Lysozym ist ein Enzym aus der Familie der Mucopolysaccharidasen und auch unter der Bezeichnung Muramidase bekannt. Zuerst entdeckt wurde es 1922 von Alexander Flemming in Hühnereiweiß. Lysozym ist ein weit verbreitetes Enzym welches in Pflanzen, Wirbellosen und Wirbeltieren vorkommt, in letzteren vor allem in Tränenflüssigkeit, Nasen- und Darmschleimhaut, Blutplasma und Muttermilch. Es weist bakterizide Eigenschaften auf [8]. Im menschlichen Organismus spielt die bakterizide Wirkung von Lysozym in der unspezifischen Abwehr von bakteriellen Infektionen eine bedeutende Rolle.

Die bakterizide Wirkung des Lysozyms beruht auf seinen hydrolytischen Eigenschaften, wobei es die Zellwand der Bakterienzellen angreift. Die Bakterienzellwand ist aus dem Peptidoglykan Murein aufgebaut, welches aus zwei Polysaccharidketten besteht. Peptidoglykane bestehen aus Strängen der zwei  $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidisch miteinander verknüpften Zuckerderivatmoleküle N - Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Diese bilden als lineare Kettenmoleküle das Rückgrat. Von jedem N-Acetylmuraminsäure-Molekül geht eine Oligopeptidkette zu einem N-Acetylmuraminsäure-Molekül eines benachbarten Stranges. Die Peptidketten binden jeweils an der Pyruvatgruppe der N-Acetylmuraminsäure-Moleküle. Dadurch ist die Bakterienzellwand netzartig aufgebaut (s Abbildung 2.8:) [84].



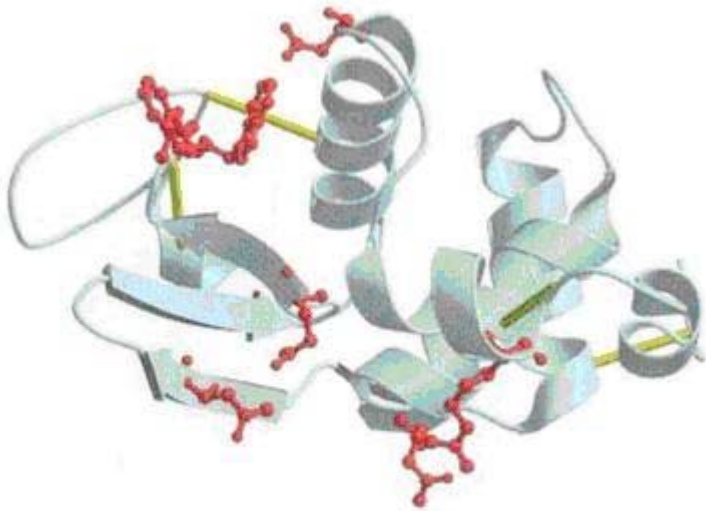


**Abbildung 2.8: Hydrolyse der glykosidischen  $\beta$ -1,4-Bindung zwischen MNAc und GlcNAc durch Lysozym.**

Als 1,4-  $\beta$ -Acetylmuramidase C ist Lysozym in der Lage die  $\beta$ -1,4-Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und der N-Acetylmuraminsäure der Bakterienzellwände zu spalten [8]. Durch die Zerstörung der Zellwand ist die Bakterienzelle dem osmotischen Eindringen von Wasser ausgesetzt, wodurch die Zelle platzt [84].

Lysozym aus Hühnereiweiß (hen egg white (HEW)-Lysozym) wird auch therapeutisch eingesetzt und ist in der Enzymdatenbank Brenda als Lysozym aus dem Organismus *Gallus Gallus* beschrieben [85]. Es handelt sich dabei um ein monomeres Polypeptid, welches aus 129 Aminosäuren besteht, ein Molekulargewicht von 14,31 kDa und einen isoelektrischen Punkt bei 11,2 besitzt. Das pH Optimum liegt bei 5,5 und der tolerierte Bereich zwischen 5-7. Eine optimale Temperatur herrscht bei 40 °C [85]. Die Aminosäuresequenz als Primärstruktur von Lysozym wurde bereits 1963 von Canfield aufgeklärt (s. Abbildung 2.9:) [86].

Als Testprotein für die vorliegende Arbeit wurde Lysozym genutzt, da es zum einen günstig bezogen werden konnte und die relativ geringe Molekülgröße für den Einschluss in das Hydrogel als geeignet schien. Eine ähnliche Molekülgröße weisen das therapeutisch interessante BMP-2 (24 kDa) sowie die hochpotenten scFv-Fragmente (25 - 30 kDa) auf [87].



**Abbildung 2.9: Dreidimensionale Darstellung des Lysozyms (aus Lehninger [84])**

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Polyethylenglykol**

Polyethylenglykol (PEG) (Pluriol E 12.000) mit einem mittleren Molekulargewicht von 10.000 - 14.000 g/mol wurde von der BASF (Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Dieses Polyethylenglykol hat sich bereits in den Arbeiten von Scheibe [36] als gut geeignet für den Aufbau eines stabilen Zwei-Phasen-Systems mit HES herausgestellt.

#### **3.1.2 Hydroxyethylstärke**

Hydroxyethylstärke 130.000 (HES 130/0,4 der Charge 21812) wurde freundlicherweise vom Hersteller Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Hydroxyethylstärke wird aus Wachsmaisstärke über methanolische Hydrolyse, Hydroxyethylierung und Reinigung durch Filtration über einen Tiefenfilter und Ultrafiltration gewonnen und besitzt ein mittleres Molekulargewicht von 130.000 und eine molare Substitution: (MS) von 0,38-0,45 [88].

Vorteil der HES 130.000 im Vergleich zu HES 200.000 (HES 200/0,5), welche in Arbeiten von Scheibe et al. verwendet wurde [36] ist eine monomodale Verteilung des Molekulargewichts (s. Abbildung 3.1). Der schwer lösliche hochmolekulare Anteil, wie er in der HES 200/0,5 vorkommt, ist hier nicht enthalten [89].

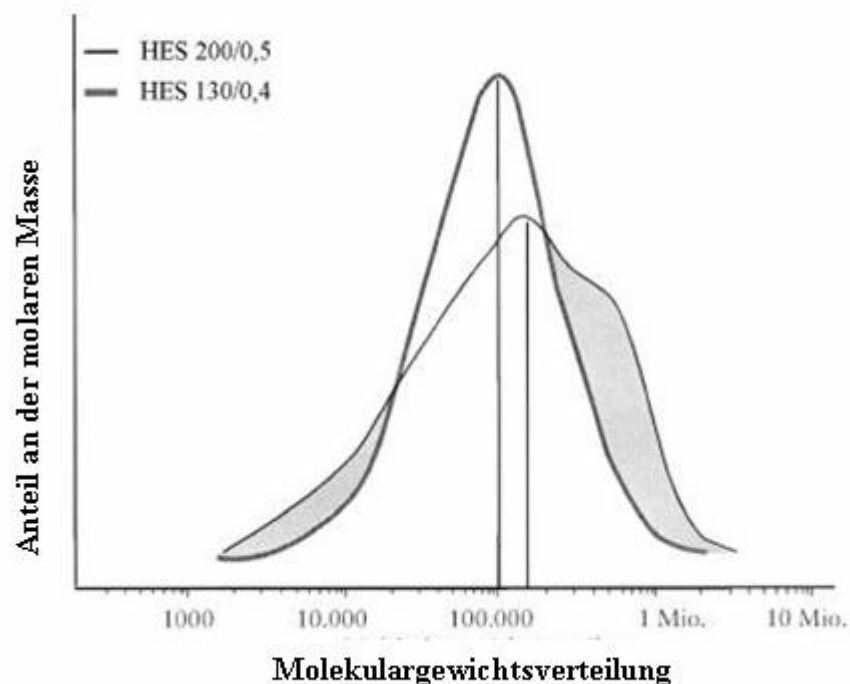
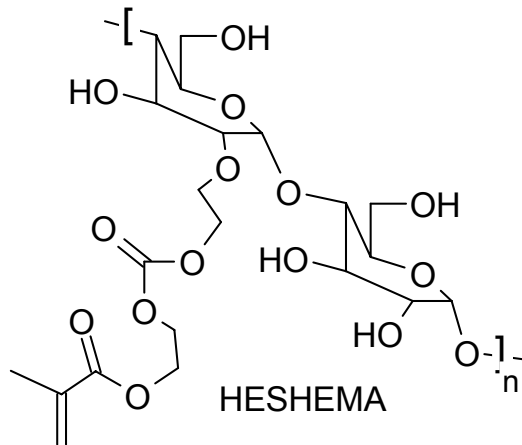


Abbildung 3.1: Molekulargewichtsverteilung von HES 200/0,5 und HES 130/0,4 aus HES-Physikochemisches Profil/Fachinformation [89]

### 3.1.3 Hydroxyethylstärke-Hydroxyethylmethacrylat

Das HEMA-Derivat von Hydroxyethylstärke (HES-HEMA) wurde nach Dijk-Wolthuis et al. [66] bzw. Heim et al. [90] von Steffen hergestellt und charakterisiert und für die vorliegenden Arbeiten zur Verfügung gestellt. Unter variierenden Herstellungsbedingungen konnten HES-HEMA Derivate mit unterschiedlichem Substitutionsgrad im Bereich von 0,01 bis 0,22 erhalten werden. Die Derivate außerhalb dieses Bereiches konnten ebenfalls synthetisiert werden, zeigten jedoch entweder keine gelbildenden Eigenschaften ( $<0,01$ ) oder keine ausreichende Wasserlöslichkeit ( $>0,22$ ).

Die HEMA-Seitengruppe besitzt eine reaktive Doppelbindung ( $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe), die radikalisch vernetzt werden kann.

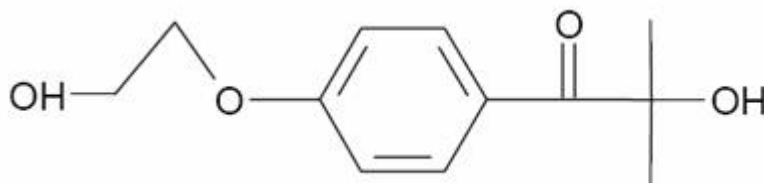


**Abbildung 3.2: Methacryloxyethyloxy-Carbonyloxyethylstärke**

### 3.1.4 Irgacure 2959<sup>®</sup>

Zum Aktivieren der Polymerisationsreaktion wurde der Photoinitiator Irgacure 2959<sup>®</sup> der Firma Ciba Specialty Chemicals (Basel, Schweiz) der Charge 0037373S eingesetzt. Irgacure 2959<sup>®</sup> gehört zur chemischen Klasse der alpha-Hydroxyketone (s. Abbildung 3.3), die nach Aktivierung mit UV-Licht im Bereich zwischen 240 – 370 nm mit ungesättigten Verbindungen in wässriger Umgebung reagieren [91].

Für den Einsatz zur Herstellung eines Hydrogel-DDS ist die gute Wasserlöslichkeit und Bioverträglichkeit von Vorteil [92].



**Abbildung 3.3: Chemische Struktur des Photoinitiators Irgacure 2959<sup>®</sup> aus CIBA Technical Data Sheet Irgacure 2959<sup>®</sup> [93]**

### 3.1.5 Chromeon-494-Lysozym

Lysozym (1,4-Beta-N-Acetylmuramidase C) ist ein globuläres Protein aus der Gruppe der Mucopolysaccharidasen. Mit einer Molekülgröße von 14,6 kDa und einem Aufbau aus 129 Aminosäuren ist es ein vergleichsweise kleines Protein.

Für die Fluoreszenzmarkierung wurde Lysozym der Firma Fluka (Steinheim, Deutschland) mit der Chargennummer Fluka ch 107385935004005 und einer Konzentration von 105000 U/mg verwendet

Die Fluoreszenzmarkierung des Lysozym wurde von Active Motif Chromeon (Regensburg, Deutschland) durchgeführt.

Der Farbstoff wird von der Firma unter dem Namen Chromeon-494 geführt. Er absorbiert Licht im Bereich von 494 nm und emittiert Fluoreszenzlicht bei 625 nm (s. Abbildung 3.4).

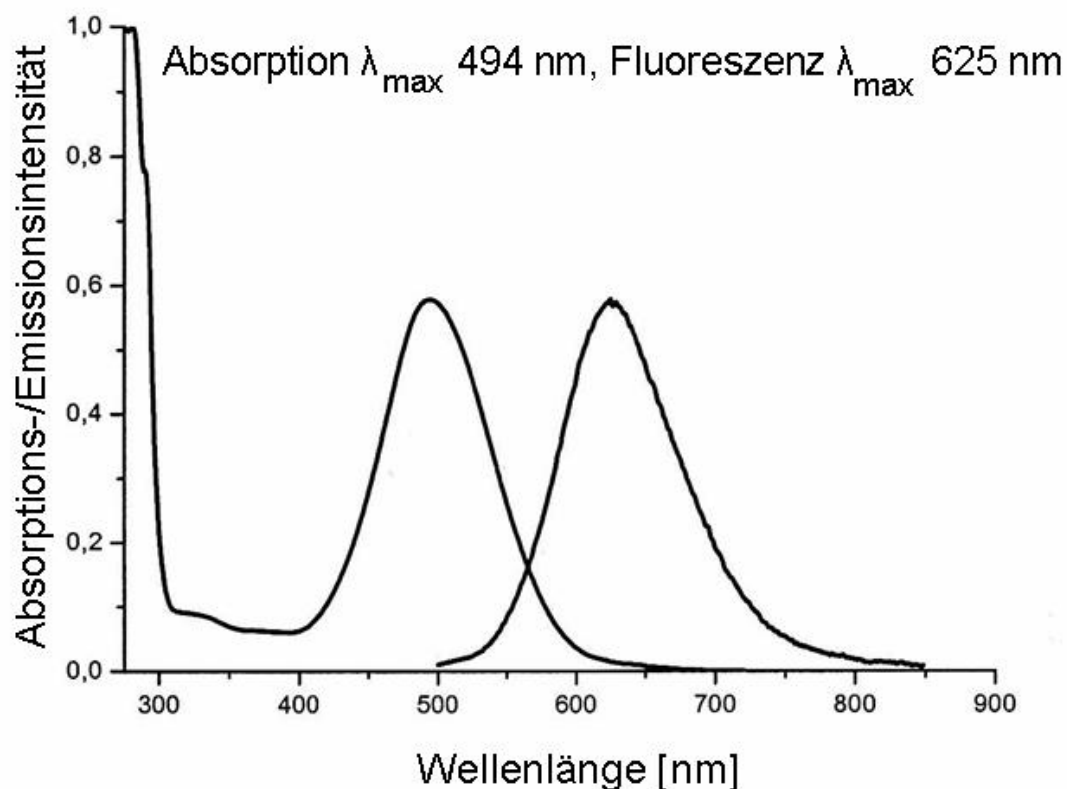


Abbildung 3.4: Absorptions-Emissionsspektrum von Chromeon 494 Lysozym aus Chromeon-494-Datenblatt

### 3.1.6 Fluorescein-isothiocyanat markiertes Dextran

Fluoresceinisothiocyanatmarkierte Dextrane (FITC-Dextrane mit den Molekulargewichten 20 kDa, 70 kDa und 500 kDa (FD 20, FD 70 und FD 500) wurde von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Die Dextrane wurden durch den Organismus *Leuconostoc mesenteroides*, Bakterienstamm B512, gewonnen. Die Chargen FD 20 122K5301, FD 70 015k5311 und FD 500 055K5313 wurden verwendet. Die Variation der Molekulargewichte wurde durch limitierte Hydrolyse und Fraktionierung durch den Hersteller erreicht. Die Fluoreszenzmarkierung wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) durchgeführt [94].

### 3.1.7 Serum

Konvertiertes humanes Serum von PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) der Charge C00104-0141 wurde verwendet.

Dieses Serum wird in Plasmapheresestationen gewonnen. Durch den Zusatz von Citrat-Phosphat-Dextrose wird Fibrinogen in Fibrin umgewandelt und anschließend durch Zentrifugation entfernt. Konvertiertes humanes Serum beinhaltet noch alle Gerinnungsfaktoren und seine Zusammensetzung entspricht weitgehend den physiologischen Bedingungen im Blut [95].

### 3.1.8 Bovine Serum Albumin (BSA)

Das verwendete BSA ist ein Produkt der Firma New England Biolabs (Massachusetts, USA) und liegt als wässrige Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml vor.

### 3.1.9 Anti-BSA

Der Antikörper gegen BSA wird aus Kaninchen durch Immunisierung mit gereinigtem BSA und anschließende Fraktionierung gewonnen.

Als lyophilisiertes Pulver wurde das Antiserum von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

Das Anti-BSA wurde mit einem Fluoreszenz Markierungsset von Perbio Science (Bonn, Deutschland) markiert und lag anschließend als 9 µg/µl konzentrierter Lösung in PBS-Puffer (Perbio Science) vor.

#### **3.1.10 Peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen Immunglobulin G**

Das Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin wird in Ziegen entwickelt, indem gereinigtes Kaninchen-IgG als Immunogen eingesetzt wurde. Der Antikörper wird durch eine immunospezifische Reinigung von übrigen Serumproteinen und Immunglobulinen, die nicht spezifisch an Kaninchen IgG binden getrennt. Der gereinigte Antikörper wird mit Meerrettich-Peroxidase (Sigma-Aldrich; München, Deutschland) gekoppelt. In einer Lösung mit einer Konzentration von 1,1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer wurde das Produkt von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) erworben.

#### **3.1.11 Fluorescein-isothiocyanat-Lysozym**

Das Lysozym wurde mit einem Fluoreszenz Markierungsset von Perbio Science (Bonn, Deutschland) markiert.

#### **3.1.12 Natriumazid**

Das Konservierungsmittel Natriumazid ist ein Produkt der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland).

#### **3.1.13 Alpha-Amylase**

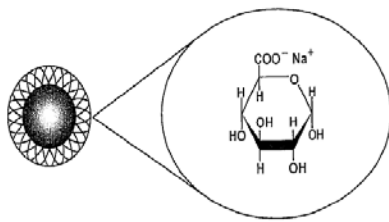
Zum beschleunigten Abbau von Hydrogelpartikeln wurde eine alpha-Amylase aus *Bacillus Subtilis* (397 U/mg, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, Charge: 0001296788-23006284) in Natriumcarbonatpuffer mit einer Konzentration von 595,5 U/ml verwendet.

Die alpha-Amylase, die zur Co-immobilisierung in Hydrogelpartikel eingesetzt wurde, ist aus humanen Speichel (Charge:WE442416/1-21407282) gewonnen und wird in der Konzentration 1 U/mg ebenfalls von Sigma-Aldrich vertrieben.



### 3.1.14 Magnetische Eisennanoteilchen

Für die Magnetrelaxometrieuntersuchungen (MRX) wurden superparamagnetische Eisennanopartikel der Firma Chemicell GmbH (Berlin, Deutschland) der Charge 1202/08 eingesetzt. Die Nanoteilchen sind mit einer Hülle aus Gummi Arabicum umschlossen und liegen in einer wässrigen Suspension mit einer Konzentration von 50 mg/ml vor. Die durchschnittliche Größe der Nanopartikel liegt bei 100 nm.



### 3.1.15 Pufferlösungen

Die verwendeten Puffersalze wurden in Milli-Q-Wasser gelöst und mit Natriumhydroxidlösung oder Salzsäure auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und autoklaviert (s. Tabelle 3.1). Für die Freisetzungsversuche wurden die Puffer mit 0,02 % Natriumazid konserviert.

**Tabelle 3.1: Zusammensetzung von Natriumphosphat- und Natriumcarbonatpuffer**

<b>Natriumphosphatpuffer 0,2M pH 7</b>	<b>Masse [g]</b>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,890
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,720
	ad 1000,0 ml Milli-Q-Wasser
<b>Natriumcarbonatpuffer 0,1M pH 9,6</b>	<b>Masse [g]</b>
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	1,86
$\text{NaHCO}_3$	2,93
	ad 1000,0 ml Milli-Q-Wasser

### **3.1.16 Milli-Q-Wasser**

Milli-Q-Wasser wurde über das Reinstwassersystem Arium 611 (Satorius, Göttingen, Deutschland) gewonnen, die nach dem Prinzip der Ultrafiltration aus Leitungswasser Reinstwasser produziert. Vor der Anwendung wurde das Milli-Q-Wasser autoklaviert.

### **3.1.17 Sonstige Materialien**

Weitere Materialien, die ausschließlich bei nachfolgend beschriebenen Methoden zur Anwendung kommen, werden im entsprechenden Methodenteil berücksichtigt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Herstellen von HES-HEMA Lösungen**

Die benötigte Menge von gefriergetrocknetem HES-HEMA wurde abgewogen und mit Natriumphosphatpuffer versetzt. Der Ansatz wurde zum Lösen über Nacht in einem auf 4 °C temperierten Raum in einem Überkopfmischer (Modell 28000, Labor-Brand, Gießen, Deutschland) in Bewegung gehalten.

### **3.2.2 Herstellung der Mikrosphären**

Die HES-HEMA Mikropartikel wurden in einem wässrigen Phasenseparationsprozess hergestellt. Dazu wurde PEG und HES-HEMA in einem Konzentrationsverhältnis 10/1 eingesetzt [36, 96]. Eine wässrige Lösung von HES-HEMA (4 %) wurde mit der einzuschließenden Substanz (s. Tabelle 3.2) und einer wässrigen Lösung des Photoinitiators Irgacure 2959<sup>®</sup> (0,1 %) angereichert.

Die zweite Phase des wässrigen Zweiphasensystems entstand durch Zugabe einer 30 %igen PEG-Lösung.

Nach 10-minütigem Kühlen in einem Eiswasserbad bei 0 °C wurde das Gemisch gleichmäßig mit Hilfe des Vortex Genie (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) auf Stufe 6 für 60 Sekunden emulgiert.

Die entstandene Emulsion wurde mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm und einer Intensität von 3 mW/cm<sup>2</sup> für 30 min bestrahlt (Modell Nu-8 KL, Benda, Wiesloh, Deutschland).

Die Mikrosphärensuspension wurde in ein Zentrifugengefäß (Corning 430829, 15 ml, Corning Incorporated, New York, USA) überführt und bei 5.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließendes Suspendieren in demineralisiertem Wasser und Abzentrifugieren dient der Reinigung der Mikrosphären von der PEG-Phase. Dieser Reinigungsschritt wurde insgesamt fünfmal durchgeführt.

Anschließend wurden die Mikrosphären in 5 ml demineralisiertem Wasser suspendiert, mit flüssigen Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (Model alpha 1-4 LO plus, Christ, Osterode, Deutschland).

Über den Gehalt der einzuschließenden Substanz in den Zentrifugationsüberständen kann die Einschlusseffizienz ermittelt werden.

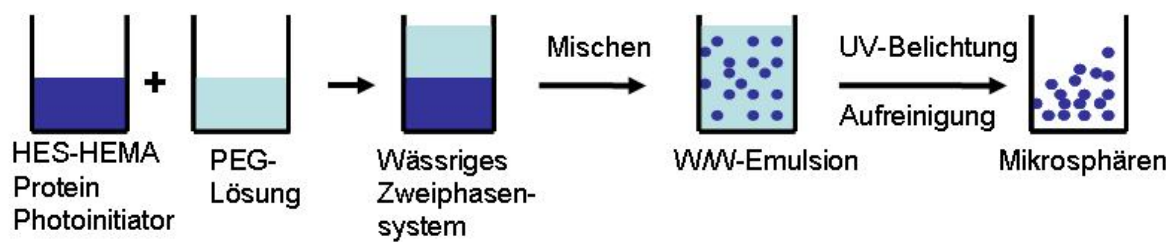
Die Photoinitiatorkonzentration wurde in den Arbeiten mit Anti-BSA für die Mikropartikelherstellung von 60 ppm auf 45 ppm, 30 ppm und 15 ppm reduziert.

**Tabelle 3.2: Zusammensetzung des wässrigen Zweiphasensystems**

<b>HES-HEMA 4% [g]</b>	<b>Protein-/ Farbstofflösung [g]</b>	<b>PEG 30% [g]</b>	<b>Initiator [ppm]</b>
4,5	4,5	6,0	60

**Tabelle 3.3: Varianten der Protein-, Farbstoff- beziehungsweise Partikellösung**

<b>Protein- /Farbstoff-/ Partikellösung</b>	<b>Menge pro Ansatz</b>
F-Lysozym	450 µg
FITC Dextran 20 kDa, 70 kDa, 500 kDa	450 µg
Anti-BSA	450 µg
FITC-Lysozym	450 µg
Alpha-Amylase	10 U/ 1 U / 0,1 U
Magnetische Nanopartikel (CCAC)	125 µg



**Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Mikropartikelherstellung über ein wässriges Zwei-Phasensystem**

### 3.2.3 Herstellung von Hydrogelzylindern

Einer 10 %igen Lösung von HES-HEMA mit demineralisiertem Wasser wurde 0,1 % Irgacure 2959<sup>®</sup> zugesetzt und in ein 150 µl Vial überführt. Dieses Gefäß wird anschließend ohne Deckel von oben mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm und einer Intensität von 3 mW/ cm<sup>2</sup> für 30 min belichtet. (Modell Nu-8 KL, Benda, Wiesloh, Deutschland)

### 3.2.4 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Leica DMLM Mikroskop (Leica Microsystems, Beusheim, Deutschland) durchgeführt und mit Hilfe einer Olympus DP12 Digital Camera (Olympus, Hamburg, Deutschland) digitalisiert. Hierfür wurden gefriergetrocknete Mikrosphären auf einem Objektträger mit einem Tropfen gereinigtem Wasser versetzt und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

### 3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Von gefriergetrockneten Mikrosphären wurden REM-Aufnahmen mit einer Zeiss DSM 940 A Anlage (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angefertigt, wobei zur Aufnahme der Bilder das Kameramodell Contax M 167 MT, Yashica-Kyocera, Hamburg, Deutschland) zusammen mit dem Orion System (Orion 5, E.L.I. sprl, Brüssel, Belgien) verwendet wurde.

Die Proben wurden mit doppelseitigem Klebeband (Tempfix) auf Aluminium-Plättchen befestigt und anschließend mit einer dünnen Goldschicht überzogen. Die

Präparate wurden mit einem Sputter Coater model E 1500 (Bio-Rad, München, Deutschland) jeweils viermal für 60 Sekunden bei 0,04 mbar mit Gold bedampft. Die Beschleunigungsspannung betrug 2,1 kV bei 20 mA.

### **3.2.6 Konfokalmikroskopie/ Laserrastermikroskopie**

Die Laserrastermikroskopie wurde bei mit FITC-Dextran beladenen lyophilisierten Proben mit dem CLSM-510META Gerät (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Zur Anregung der Fluoreszenzmoleküle wurde ein Argonlaser mit der Wellenlänge 488 nm zusammen mit einem Strahlenteiler 488/543/633 nm eingesetzt. Das emittierte Licht wurde mit einem Bandpassfilter 505-530 nm detektiert. Die Blendengröße (pinhole) betrug 78  $\mu\text{m}$ .

Für Chromeon-494-Lysozym beladene Mikropartikel wurde ein Teil der gefriergetrockneten Proben auf einen Objektträger aufgebracht, in Glycerol 85 % dispergiert und mit der Fluoreszenz-Einheit und dem Apotome des Axio Imager Z 1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Diese Arbeiten wurden am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Tübingen von Sandra Barisch durchgeführt.

### **3.2.7 Kryo-REM**

Für die Kryo-REM-Aufnahmen wurden die Hydrogelproben durch rasches Eintauchen in flüssigen Stickstoff abgekühlt. Die Proben wurden bei  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefriergebrochen. Anschließend wurden die Bruchstücke für 60 s bei  $-98\text{ }^{\circ}\text{C}$  geätzt und in einer GATAN Alto 2500 Cryo-Präparationskammer (Oxford, Großbritannien) mit Platin bedampft und in das REM (S-4800, ausgestattet mit einem Feldemissionsstrahler, Hitachi, Tokyo, Japan) analysiert.

Diese Arbeiten wurden an der Universität Potsdam am Institut für Chemie, Professur für Kolloidchemie, durch Frau Brigitte Tiersch durchgeführt.

### **3.2.8 Partikelgrößenbestimmung**

Die Partikelgröße der Mikrosphären wurde mit dem Laserlichtstreugerät Beckman Coulter LS 13320 PIDS (Fullerton, USA) bestimmt. Um die Agglomerationsneigung der Mikrosphären zu unterbinden, wurde eine Menge von

5-10 mg Mikrosphären in 2 ml Glycerol 85 % suspendiert und für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Im Probenmessraum des Gerätes wurde die Suspension anschließend auf ein Volumen von etwa 125 ml mit gereinigtem Wasser verdünnt und vermessen. Die Proben wurden jeweils im dreifachen Ansatz vorbereitet und vermessen.

Die softwareunterstützte Auswertung basierte auf der Theorie nach Mie.

### **3.2.9 In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen der Mikrosphären**

Ungefähr 15 mg der gefriergetrockneten Mikrosphären wurden in verschraubbare Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) genau abgewogen und jeweils mit 1 ml Akzeptormedium versetzt. Die Suspension wurde aufgeschüttelt und in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) bei 37 °C und gleichmäßiger Geschwindigkeit inkubiert. Die Freisetzungsversuche wurden jeweils als Triplikat angesetzt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Mikropartikel über 1 Minute bei 13.000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, Osterode, Deutschland) und 500 µl des Überstandes wurde entnommen. Das fehlende Volumen wurde durch frisches, auf 37 °C temperiertes Akzeptormedium ersetzt, die Mikropartikel erneut aufgeschüttelt und weiter inkubiert. Als Akzeptormedien kamen 0,2 M-Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7), 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, (pH-Wert 9,6) und humanes konvertiertes Serum zum Einsatz. Die Akzeptormedien wurden zum Schutz vor mikrobiellem Wachstum mit 0,02 % Natriumazid und im Falle des Serums zusätzlich mit 10 µg/ml Tetrazyclin (Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Charge 17787088) versetzt.

### **3.2.10 In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen der Gelzylinder**

Die Gelzylinder wurden unmittelbar nach der Herstellung gewogen und in 1 ml Akzeptormedium in einem Schraubgefäß suspendiert (s.o.).

### **3.2.11 Abbau in alpha-Amylase-Lösung**

Von den gefriergetrockneten Mikrosphären wurden im dreifachen Ansatz ca. 5,00 mg (genau gewogen) in ein Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gewogen, mit 1 ml Enzymlösung versetzt und im

Schwimmer im Wasserbad bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert bis alle Mikrosphären sichtbar aufgelöst waren.

### 3.2.12 Fluoreszenzmessung

Die gesammelten Proben aus den Freisetzungsuntersuchungen wurden in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert (Microplatte, 96 Well, F-Boden (Kaminform), Fluotrac 200, Medium Bindung, Schwarz, Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Germany) und im Fluoreszenz-Mikroplatten-Lese-Gerät von Tecan (Tecan Ultra, Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) vermessen.

### 3.2.13 ELISA

In antigenbindenden ELISA-Maxisorb-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurden pro Vertiefung 1 µg/100µl BSA in PBS-Puffer über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert, um BSA an die Oberfläche zu binden. Die Platte wurde anschließend dreimal mit PBST (PBS + 0,1% (v/v) Tween 20) im ELISA Washer (Columbus, Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) gewaschen, um nicht gebundenes BSA zu entfernen. Zum Abblocken von unspezifischen Bindungsreaktionen wurde 350 µl Blockreagenz (2 % (w/v) Magermilchpulver in PBST) in die Vertiefungen gegeben und nach 1,5 h bei Raumtemperatur durch dreimaliges Waschen (s.o.) entfernt.

Die Proben aus den Freisetzungsversuchen wurden 2:1 mit MPBST 6 % verdünnt und 100 µl dieser Mischung wurde in die Vertiefungen der Platte pipettiert, für 1,5 h einwirken gelassen und anschließend dreimal gewaschen (s.o.).

Als zweiter Antikörper wurde eine Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockingreagenz eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h und dreimaligem Waschen wurde 100 µl Substratlösung (TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) in die Vertiefungen gegeben und nach einer ausreichenden Blaufärbung mit 100 µl 0,5 M-Schwefelsäure abgestoppt. Die entstandene gelbe Färbung konnte im Multiplattenreader Tecan Sunrise bei einer Absorption von 450/ 620 nm vermessen werden. Als Kontrolle wurde die BSA-Lösung, die erste bzw. die zweite Antikörperlösung durch PBS bzw. Blockreagenz ersetzt. Die Standardwerte wurden vergleichbar zu den Proben behandelt.

### **3.2.14 Antikörperstabilitätsuntersuchungen**

Fluoreszenzmarkiertes Anti-BSA wurde auf seine Stabilität gegenüber den Bestandteilen des wässrigen Zweiphasensystems sowie gegenüber UV-Licht untersucht. Die Antikörperaktivität wurde mittels ELISA gemessen; zusätzlich wurde die Fluoreszenzaktivität ermittelt.

Sowohl die in Natriumphosphatpuffer gelösten Einzelsubstanzen des Herstellungsprozesses wurden vor und nach Bestrahlen mit UV-Licht auf die Auswirkung auf die Antikörperstabilität untersucht (s. Tabelle 3.4), als auch das gesamte wässrige Zweiphasensystem vor und nach UV-Bestrahlung. Die Zweiphasensysteme wurden so gewählt, dass sie dem Herstellungsprozess entsprachen aber keine Polymerisation stattfinden konnte, um die Antikörperaktivität und Fluoreszenzaktivität zu untersuchen. Dazu wurden Systeme gewählt, in denen einmal HES-HEMA gegen HES ausgetauscht wurde, ein anderes Mal kein Photoinitiator zugesetzt war (s. Tabelle 3.5 und 3.6).

In den Untersuchungen der Einzelkomponenten wurde eine Antikörperkonzentration von 31,5 µg/ml eingesetzt, in den wässrigen Zweiphasensystemen insgesamt 450 µg pro Ansatz.



**Tabelle 3.4: Konzentration der Einzelkomponenten zur Antikörperstabilitätsuntersuchung**

<b>Einzelkomponenten</b>	<b>Gehalt</b>
HES-HEMA (DS 0,16)	1,2 % m/m
HES	1,2 % m/m
Natriumphosphatpuffer	0,2 M
Photoinitiator (PI)	15 ppm 30 ppm 45 ppm 60 ppm

**Tabelle 3.5: Wässriges Zweiphasensystem (ATPS) ohne Photoinitiator (PI)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>HES-HEMA 4% [g]</b>	<b>Protein- Farbstofflösung [g]</b>	<b>PEG 30% [g]</b>	<b>Puffer[ppm]</b>
ATPS o PI	4,5	4,5	6,0	60

**Tabelle 3.6: Wässriges Zweiphasensystem (ATPS) mit Photoinitiator (PI)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>HES 4% [g]</b>	<b>Protein- Farbstofflösung [g]</b>	<b>PEG 30% [g]</b>	<b>Photoinitiator [ppm]</b>
ATPS+PI 1	4,5	4,5	6,0	60
ATPS+PI 2	4,5	4,5	6,0	45
ATPS+PI 3	4,5	4,5	6,0	30
ATPS+PI 4	4,5	4,5	6,0	15

Nach dem Herstellen der Antikörperlösungen und der Zweiphasensysteme wurde 1 ml der Lösung abgenommen und bei -20 °C in Reaktionsgefäße (1,5 ml Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) eingefroren. Der verbliebene Teil wurde für 30 min mit UV-

Licht der Stärke von 3 mW/ cm<sup>2</sup> mit einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt und anschließend bis zu den weiteren Untersuchungen bei -20 °C aufbewahrt.

Alle Untersuchungen wurden im Triplikat angesetzt und vermessen.

### **3.2.15 Dinitrosalicylsäure (DNS)**

200 g Kalium-Natriumtartrat 4H<sub>2</sub>O (Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 0,5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland), 2 g Phenol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 10 g 3,5-Dinitrosalicylsäure (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) werden in 500 ml einer 2 % NaOH Lösung gelöst und mit destillierten Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, filtriert und in der Kälte aufbewahrt.

Die Proben wurden 1:1 mit DNS-Reagenz gemischt und im Wasserbad bei 95 °C für 10 Minuten erhitzt. Zum Messen der Absorption wurden die Lösungen in einer Polypropylen-Platte mit 96 U-förmigen Vertiefungen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt und im Multiplatten-Lesegerät bei 620 nm vermessen.

Eine Standardreihe mit reiner Glucose wurde in gleicher Weise behandelt.

### **3.2.16 Magnetrelaxometrie**

#### **3.2.16.1 Theorie**

Bei der Magnetrelaxometrie werden magnetische Nanopartikel mit einem Magnetfeldpuls magnetisiert. Durch das angelegte Magnetfeld richten sich die magnetischen Momente der Nanopartikel entlang der magnetischen Feldlinien aus. Nach sprunghaftem Ausschalten des Magnetfeldes wird das Abklingen des magnetischen Signals durch supraleitende Quanteninterferometer (SQUIDs) [97-99] oder Fluxgate-Sensoren [100] gemessen. Die Relaxation des magnetischen Signals kann über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen, welche Aufschluss über die Beweglichkeit der Nanopartikel in der Probe geben. Ein Mechanismus ist die Brown-Relaxation, bei der sich das ganze Partikel inklusive seiner Hülle dreht, in diesem Fall ist das Partikel voll beweglich. Dieser Mechanismus ist proportional zum hydrodynamischen Volumen des Partikels (Gleichungen 4.1):

$$\tau_B = \frac{3V_h * \eta}{k_B * T} \quad \text{Gleichung 4.1}$$

$V_h$     *hydrodynamisches Volumen*

$\eta$       *Viskosität der Flüssigkeit*

$\tau$        *Zeitkonstante*

$T$        *Temperatur*

$B$        *Magnetische Flussdichte*

$k_B$      *Boltzmann-Konstante*

Ist die freie Beweglichkeit des Partikels nicht gegeben, kann die Relaxation über den Mechanismus der Néel-Relaxation erfolgen. Bei diesem Prozess dreht sich die Magnetisierung im Kern des Partikels, um eine Relaxation zu erreichen. Dieser Mechanismus ist exponentiell vom Kernvolumen abhängig (Gleichung 4.2):

$$\tau_N = \tau_0 * \exp\left(\frac{K * V_k}{k_B * T}\right) \quad \text{Gleichung 4.2}$$

$\tau$        *Zeitkonstante*

$V_k$      *Kernvolumen*

$T$        *Temperatur*

$K$        *effektive Anisotropiekonstante*

$k_B$      *Boltzmann-Konstante*

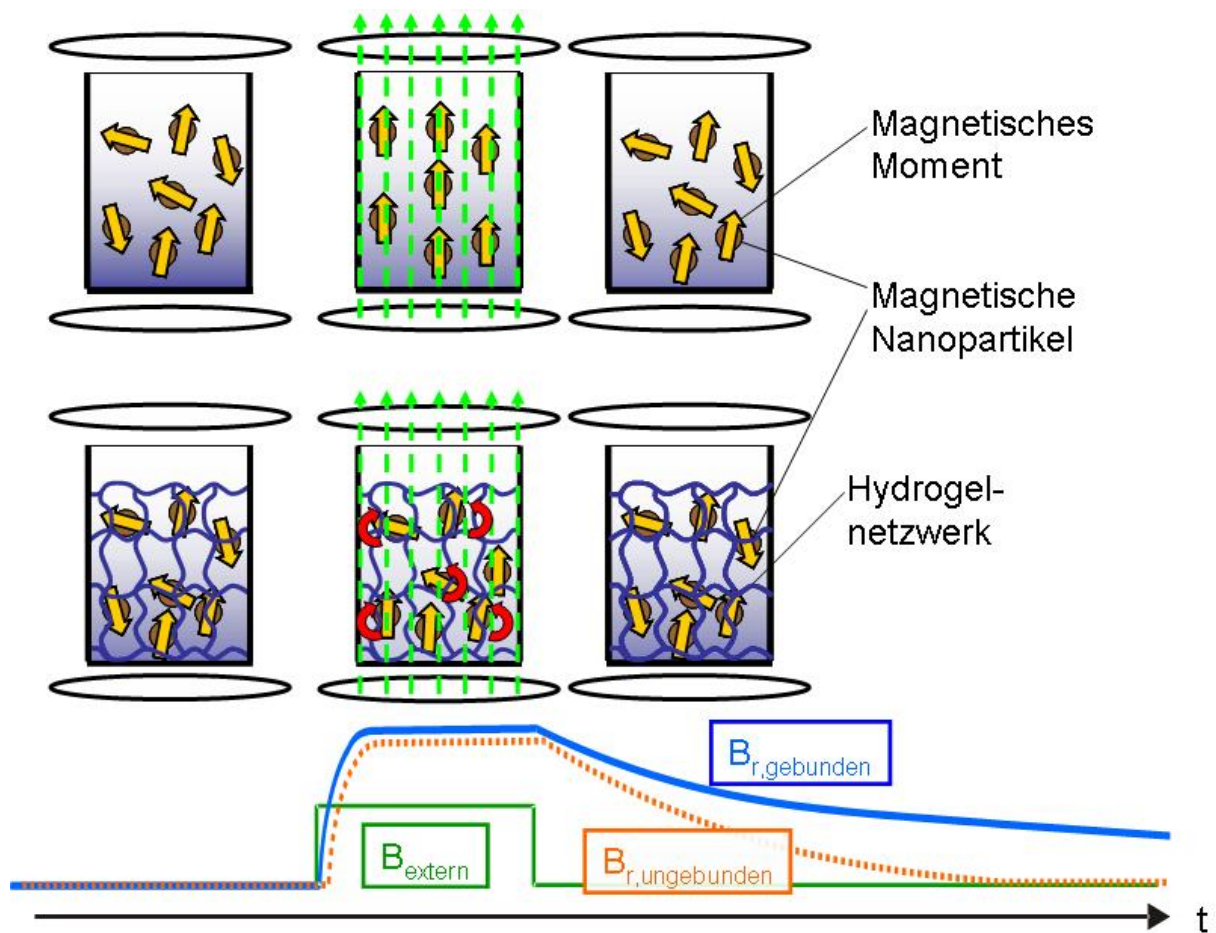
Sind beide Mechanismen möglich, so dominiert in einem MRX-Experiment stets der schnellere, was in einer effektiven Zeitkonstante resultiert (Gleichung 4.3):

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N} = \frac{\tau_B * \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

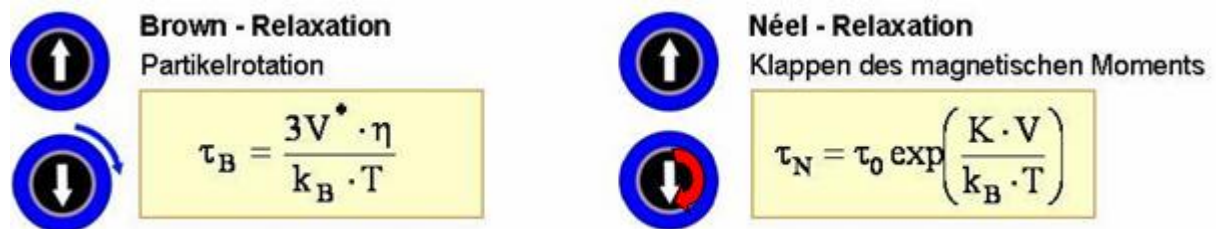
Da das gemessene magnetische Signal eine Superposition der beiden Mechanismen enthält, lässt sich damit ein Verhältnis zwischen frei beweglichen und in ihrer Beweglichkeit gehemmten Nanopartikeln schließen (s. Abbildung 3.6 (a)).

Schematisch veranschaulichen lässt sich der Unterschied zwischen Brown- und Néel-Mechanismus durch Abbildung 3.6 (b), in der die Beweglichkeit über Pfeile dargestellt wurde.

a



b



- $V^*$  hydrodynamisches Volumen  
 $\eta$  Viskosität der Flüssigkeit  
 $\tau$  Zeitkonstante  
 $V$  Kernvolumen  
 $T$  Temperatur  
 $K$  effektive Anisotropiekonstante  
 $B$  Magnetische Flussdichte  
 $k_B$  Boltzmann-Konstante

Abbildung 3.6: (a) Schematische Darstellung der MRX-Messungen von Nanopartikeln im Hydrogel, (b) des Verhaltens von beweglichen und immobilisierten Nanopartikeln sowie der Berechnung der Relaxationskurven

Die Relaxation einer polydispersen Probe aus mobilen Nanopartikeln lässt sich über die Gleichung 4.4 (1) beschreiben [100, 101]. Die Werte  $\tau_{\text{mobil}}$ ,  $\beta$  und  $\tau_{\text{immobil}}$  sind konzentrationsunabhängige spezifische Konstanten für eine Ferrofluidcharge und können über die Messung einer mobilen Nanopartikel-Referenz ( $\tau_{\text{mobil}}$ ,  $\beta$ ) bzw einer immobilisierten Nanopartikel -Referenz ermittelt ( $\tau_{\text{immobil}}$ ) werden.

Die Relaxationskurve für immobilisierte Nanopartikel ergibt sich aus Gleichung 4.4 (2) [102].

Um eine Änderung der Beweglichkeit der Nanopartikel in einer Probe quantifizieren zu können, wird die Relaxationskurve als eine Überlagerung der beiden Mechanismen beschrieben (s. Gleichung 4.4 (3)) [103].

$$B(t) = B_{\text{off}} + B_{\text{mobil}} * \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau_{\text{mobil}}}\right)^{\beta}\right) \quad \text{Gleichung 4.4(1)}$$

$$B(t) = B_{\text{off}} + B_{\text{immobil}} * \ln\left(1 + \left(\frac{t}{\tau_{\text{immobil}}}\right)\right) \quad \text{Gleichung 4.4 (2)}$$

$$B(t) = B_{\text{off}} + B_{\text{mobil}} * \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau_{\text{mobil}}}\right)^{\beta}\right) + B_{\text{immobil}} * \ln\left(1 + \left(\frac{\tau_{\text{immobil}}}{t}\right)\right) \quad \text{Gleichung 4.4 (3)}$$

$\tau$	charakteristische Zeitkonstante des Ferrofluids
$\beta$	Maß für die Breite der Größenverteilung der Nanopartikel
$\tau_{\text{mobil}}$	Brownsche Relaxationszeitkonstante für mobile Nanopartikel
$\tau_{\text{immobil}}$	Néelsche Relaxationszeitkonstante für immobile Nanopartikel
$B_{\text{off}}$	Offset der magnetischen Flussdichte
$B_{\text{mobil}}$	Amplitude der magnetischen Flussdichte für mobile Nanopartikel
$B_{\text{immobil}}$	Amplitude der magnetischen Flussdichte für immobile Nanopartikel
$t$	Zeit

Einschränkungen in dieser Auswertungsmethode sind eine veränderliche Viskosität sowie starke Störsignale aus der Umgebung.

In den Arbeiten von Heim et al. wurde bereits gezeigt, dass sich MRX-Messungen für die Beobachtung der Vernetzung von HES-HEMA-Gelen einsetzen lassen [90, 103, 104].

Magnetische Nanopartikel, die für den Einschluss im Hydrogel geeignet sind, sind Partikel mit einer Hülle aus Gummi-Arabicum. Wird die Hülle der Nanopartikel durch chemische oder physikalische Zersetzung angegriffen, äußert sich das in der Regel durch eine Agglomeration der Partikel und daher in einer verzögerten Relaxationskurve. Die Nanopartikel mit einer Gummi-Arabicum Hülle sind inert gegen den Photoinitiator Irgacure 2959<sup>®</sup> und UV-Lichtbestrahlung bei 366 nm, 3 mW/cm<sup>2</sup> über 75 min [103].

MRX-Messungen werden bereits für magnetische Magnetrelaxationsimmunoassays (MARIA) eingesetzt. Hierzu werden die MNPs funktionalisiert und an biologische Zielmoleküle (Proteine, Zellen, Zellfragmente, Bakterien) gebunden. wodurch eine Abnahme des Brownschen-Relaxationsverhalten ermittelt werden kann [105].

### **3.2.16.2 MRX Versuchsaufbau**

Der Aufbau der Messapparatur besteht aus einem Helmholtz-Spulensystem zur Aufmagnetisierung der Probe und einer differentiellen Fluxgate-Anordnung. Das Probengefäß sitzt zwischen den differentiell angeordneten Fluxgate-Sensoren. Diese Sensoren sind mit ihrer empfindlichen Achse senkrecht zum homogenen Magnetisierungsfeld der Helmholtz-Spule angebracht (s. Abbildung 3.8 ). Dadurch können die Sensoren nur das Streufeld der Proben detektieren. Durch die differentielle Anordnung der Sensoren können Hintergrundsignale kompensiert werden und das Streufeld der Probe doppelt aufgenommen werden [90, 102-104].

Die Messapparatur war während der Untersuchungen nicht abgeschirmt, wodurch die Messungen gewissen Störungen aus der Umgebung ausgesetzt waren.

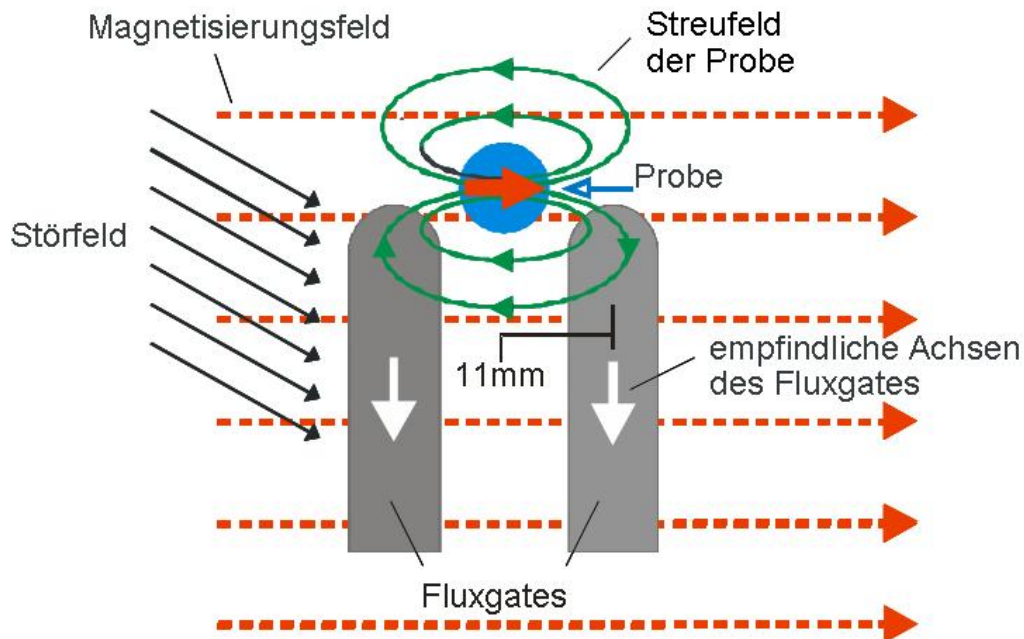


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des MRX-Messaufbaus



Abbildung 3.8: Abbild einer Helmholtz-Spule und eines Probengefäßes zwischen zwei Fluxgate-Sensoren



Um den Einfluss des Akzeptormediums auf die magnetischen Nanopartikel zu untersuchen, wurden diese über die gesamte Dauer des Experiments bei 37 °C in alpha-Amylase Lösung inkubiert und ihr Relaxationsverhalten zu bestimmten Zeitpunkten gemessen.

Eine Herausforderung bei der Magnetrelaxometrie ist, dass ausreichend viele Nanopartikel im Messsystem enthalten sein müssen, um ein auswertbares Messsignal zu erhalten.

Die eingeschlossene Menge an Hydrogelen ist allerdings aufgrund der Störung der Gelbildung beschränkt [103].

Eine weitere Limitation ist die Messzelle selber, in die ein Mikroliter-Probengefäß mit einem Volumen von 250 µl passt.

Für Untersuchungen des Hydrogelabbaus, wurden Hydrogelzylinder (pro DS 3 Gelzylinder) mit 2 µl MNP-Lösung hergestellt und mit 100 µl einer alpha-Amylase Lösung 595,5 U/ml (pH-Wert = 9,6) überschichtet und in einem Thermomixer (eppendorf comfort mit Aufsatz für 1,5 ml Gefäße, Hamburg, Deutschland) bei 37 °C und 300 rpm inkubiert.

Zum Messen des magnetischen Relaxationsverhaltens wurden die Mikrolitergefäße in die Messkammer gegeben und zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen.

Die Proben wurden mit dem MRX-Forschungssystem mit Standardparametern für flüssige Proben gemessen. Hierbei wurden die Probe in dem Aufmagnetisierungsfeld  $B_{\text{mag}}$  mit 2 mT für 2 Sekunden ausgerichtet (Aufmagnetisierungszeit  $t_{\text{mag}}$ ) und über 1,5 Sekunden Relaxationszeit ( $t_{\text{rel}}$ ) vermessen. Bei jeder Messung wurden die Proben 20-mal aufmagnetisiert. Die Pausen zwischen dem Aufmagnetisieren und der Relaxationszeit dauerten 2 Sekunden. Die Temperatur in dem Messaufbau betrug 25 °C.

Zwischen den verschiedenen Proben wurden Leermessungen durchgeführt um das Hintergrundsignal (Offset) zu ermitteln.

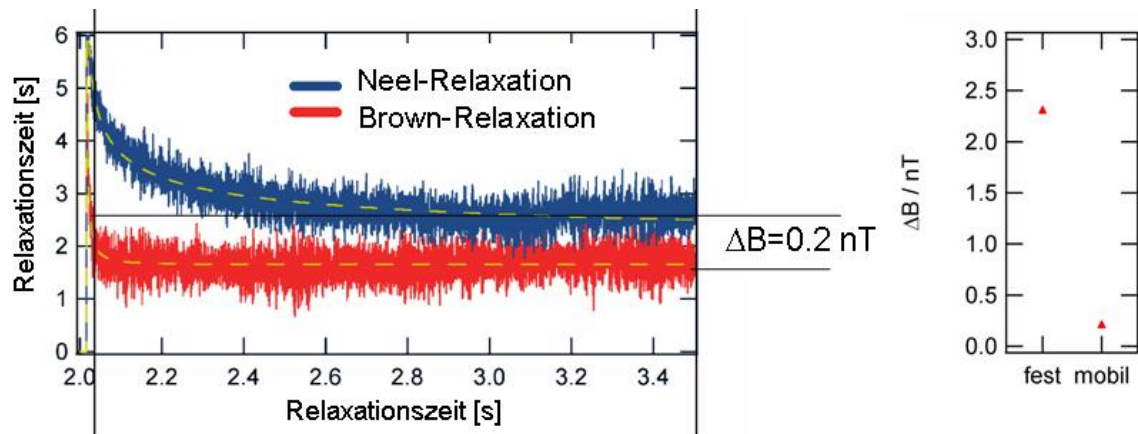
Als Referenzproben wurden 2 µl der magnetischen Nanopartikel in unpolymerisierter HES-HEMA-Lösung (10% m/m) mit 100 µl alpha-Amylase Lösung präpariert und über den gesamten Messzeitraum ihr Relaxationsverhalten beobachtet. Hierdurch sollte der Einfluss der alpha-Amylase auf die Viskosität untersucht werden.

Für ein reines Néel-Verhalten wurde ein mit Nanopartikeln beladener Hydrogelzylinder gefriergetrocknet und untersucht.

Für einen Vergleich der MRX Ergebnisse mit Freisetzungsversuchen aus Hydrogelen, wurden Hydrogelzylinder mit mittlerem DS mit 100 µg FITC-Lysozym beladen in vergleichbarer Weise hergestellt, mit 100 µl alpha-Amylase überschichtet und im Thermoschüttler inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 50 µl der alpha-Amylase Lösung entnommen und durch frische alpha-Amylase Lösung ersetzt. Die entnommene alpha-Amylase Lösung wurde 1: 600 mit Milli Q Wasser verdünnt und im Fluoreszenzmessgerät vermessen. Ein Blindwert und die Standardreihe wurden durch Mischen von Milli Q Wasser bzw FITC-Lysozym in alpha-Amylase Lösung und anschließender 1: 600 Verdünnung mit Milli Q-Wasser hergestellt.

### **3.2.16.3 Auswertung der Relaxationskurven**

Für die Auswertung der Degradation der Gelzylinder wurde aus den Relaxationskurven zu jedem Messzeitpunkt eine magnetische Differenz des Relaxationsfelds ermittelt (s. Abbildung 3.9). Dieser Differenzwert ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen zwei festgelegten Punkten auf der Relaxationskurve. Der erste Zeitpunkt, der für diesen Verhältniswert herangezogen wird liegt bei 15 ms nach Ausschalten des Magnetisierungsfeld, der zweite bei 1400 ms, dort ist eine vollständige Relaxation der MNPs zu erwarten. Je kleiner dieser Verhältniswert ausfällt, umso höher ist der Anteil der Brownrelaxation und damit die Beweglichkeit der MNPs. Der Verhältniswert, der bei uneingeschränkter Beweglichkeit vorliegt wird gleich 1 gesetzt. Diese Werte aufgetragen gegen die Zeit lassen qualitative Aussagen über die Beweglichkeit der MNPs mit zunehmender Inkubationszeit zu.



**Abbildung 3.9:** Auswertung der Relaxationskurven; links: Relaxationskurven von MNPs mit Néel und mit Brownschen-Relaxationsverhalten; rechts: Darstellung der Differenzwerte ermittelt aus den Relaxationskurven

### 3.2.17 Quellungsmessung

Für die Quellungsmessungen der Mikrosphären, wurden mehrere Ansätze von ca. 5 mg Mikrosphären in ein Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1 ml Natriumphosphatpuffer pH 7 suspendiert und bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 10 min, 1 h, 47 h, 7 d und 19 d wurden Ansätze entnommen und mit 2 ml Glycerol versetzt und mittels PIDS-Technologie hinsichtlich ihrer Partikelgröße vermessen (s. 3.2.8).

### 3.2.18 pH-Wert Bestimmung

Der pH-Wert der verwendeten Pufferlösungen und der Probenlösungen wurde mit dem pH-Meter Knick G46 (Berlin, Deutschland) bestimmt. Zur Kalibrierung der Glaselektrode wurden Standardpuffer der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) mit den pH-Werten 4,0 und 7,0 eingesetzt.

### **3.2.19 Lagerung und Handhabung von Proteinen und Antikörpern**

Lysozym, BSA, Anti-BSA und Anti-Anti-BSA wurden bei -20 °C in Form von Aliquots gelagert. Zum Gebrauch wurde die benötigte Menge auf Eis aufgetaut und im Fall von Fluoreszenzmarkierten Proben vor Licht geschützt.

### **3.2.20 Bestimmung des initialen Wassergehaltes**

Nach der Herstellung und Aufreinigung der Mikrosphären wurden einzelne Chargen auf ihren Wassergehalt unmittelbar nach der Produktion untersucht. Hierzu wurden die Mikrosphärensuspension in tarierte Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der letzte Rest des Überstandes mit Hilfe einer Kapillare entfernt wurde.

Die Zentrifugenröhrchen wurden geöffnet, mit einem perforierten Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Chicago, USA) überzogen und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff in einem Rundkolben an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen.

Nach dem Trocknen wurden die Zentrifugenröhrchen ausgewogen.

### **3.2.21 Viskositätsmessung**

Für die Bestimmung der Viskosität wurde eine 10 prozentige HES-HEMA Lösung bei einer Schergeschwindigkeit von  $200\text{ s}^{-1}$  mit dem Rheometer Haake Viscotester 550 (Gebrüder Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland), betrieben mit dem Haake Rheowin Job Manager, aufgenommen. Während der Messung wurde die Temperatur auf 37 °C gehalten (Haake K10 Wasserbad). 9 ml der Flüssigkeit wurde dafür in ein Doppelwandzylinder überführt. Um eine Viskositätsänderung durch Zugabe von alpha-Amylase zu beobachten, wurde der HES-HEMA-Lösung 6 ml alpha-Amylase-Lösung (s. Absatz 3.1.13) zugesetzt, bei 37 °C inkubiert und zu verschiedenen Messpunkten untersucht.

## 4 Versuchsergebnisse und Diskussion

### 4.1 Mikropartikel Charakterisierung

#### 4.1.1 Morphologie

Die nach dem unter Absatz 3.2.2 beschriebenen Verfahren hergestellten Mikropartikel sind rund und zeigen in der REM Aufnahme eine glatte Oberfläche (s. Abbildung 4.1, 4.2). Raue Stellen bzw. kleine aufgelagerte Flöckchen an der Oberfläche der Partikel bestehen vermutlich aus HES-HEMA. Dieses ist zu einem geringem Anteil auch in der PEG-Phase gelöst [36] und kann durch die Polymerisation in Form von Flöckchen ausfallen. Eine andere Vermutung wären Salzreste der Pufferlösung, die nicht komplett ausgewaschen wurden. Einzelne Risse, die an der Oberfläche in der REM-Aufnahme zu sehen sind, sind vermutlich auf den Trocknungsprozess zurückzuführen.

Der initiale Wassergehalt der Mikropartikel nach der Herstellung beträgt  $77 \% \pm 2 \%$ .

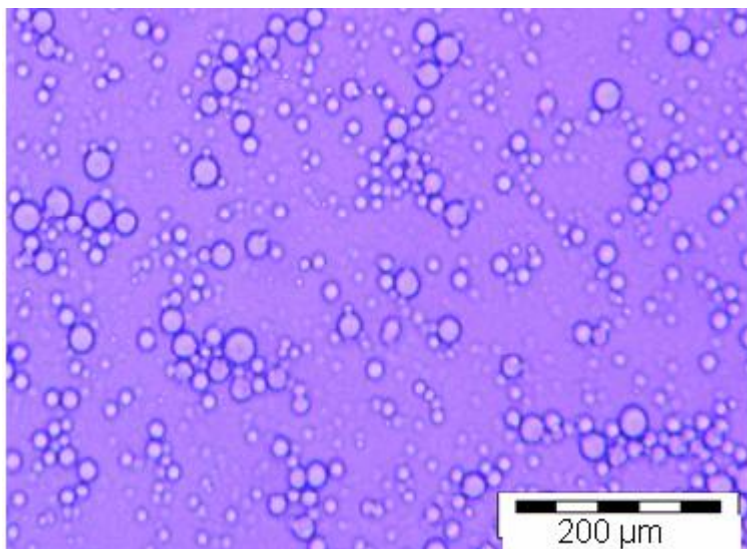
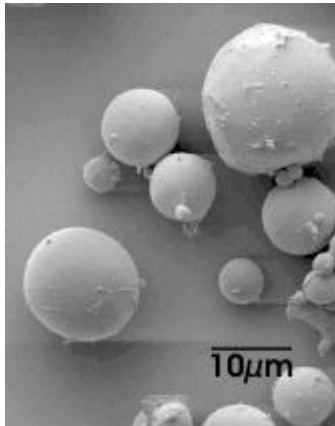
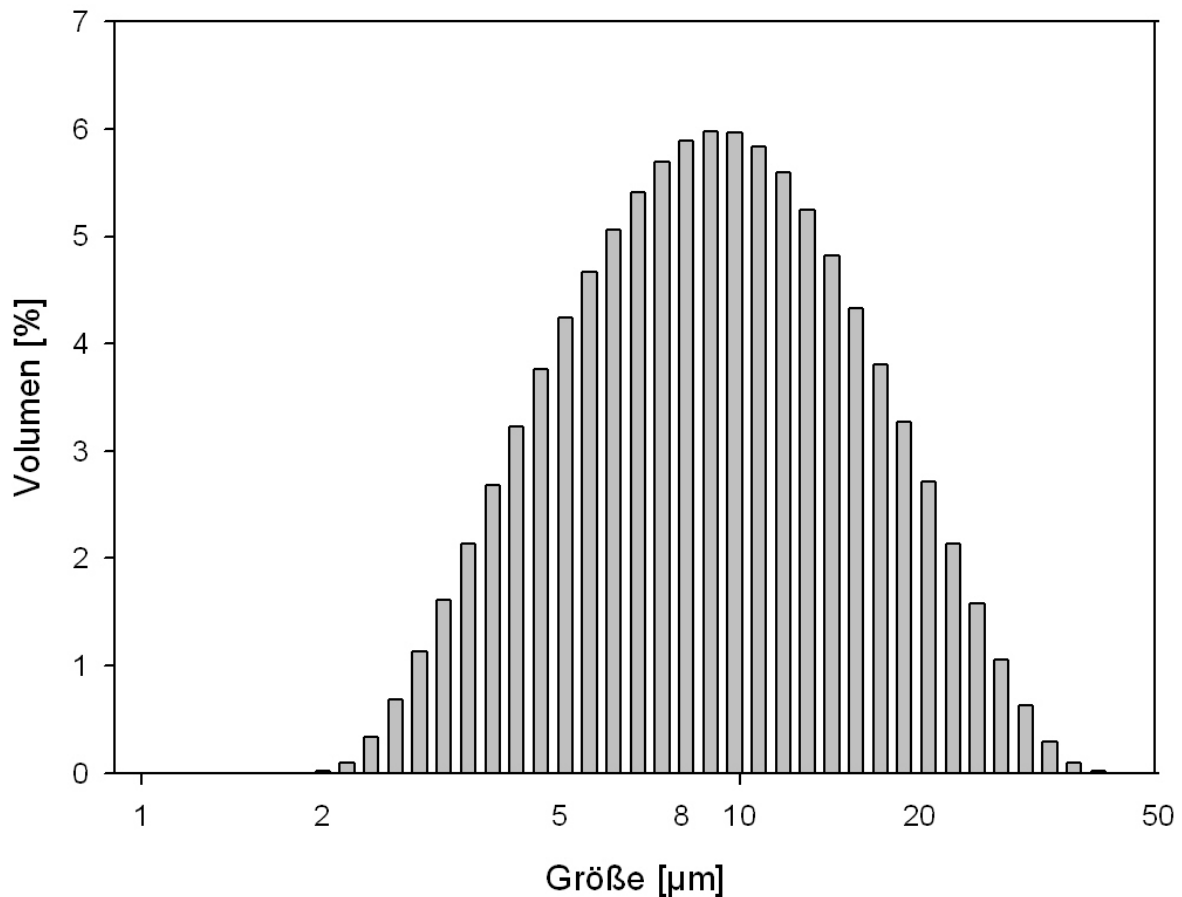


Abbildung 4.1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer wässrigen Mikropartikelsuspension



**Abbildung 4.2: REM-Aufnahme von lyophilisierten Mikropartikeln**

#### 4.1.2 Partikelgrößenverteilung



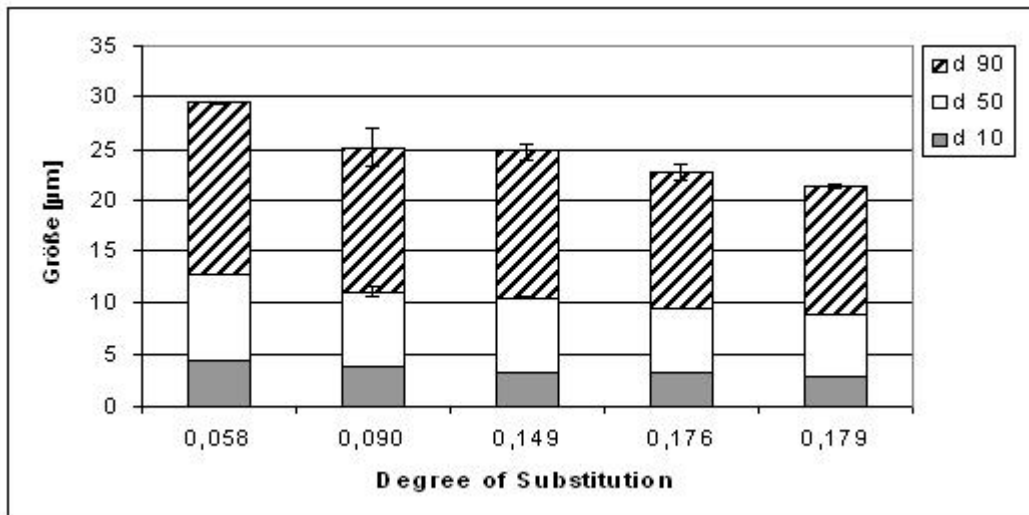
**Abbildung 4.3:** Beispiel für eine Partikelgrößenverteilung von HES-HEMA-Mikrosphären (DS 0,05)

Die Partikelgröße liegt eng verteilt zwischen 2 und 45 µm und weist eine für Emulsionen typische logarithmische Normalverteilung auf (s. Abbildung 4.3). Der Modalwert der Partikelgrößenverteilung beträgt hierbei 10 µm.

Die Partikelgrößenverteilung lässt sich auch über die d10, d50 und d90-Werte charakterisieren. Hierbei gibt der d10-Wert eine Grenze in µm an, die besagt, dass 10 % der Mikrosphären der Verteilung einen kleineren Durchmesser haben als der

angegebene Größenwert. Der d50-Wert entspricht analog einer Durchgangssumme von 50 %, der d90-Wert einer Durchgangssumme von 90 %.

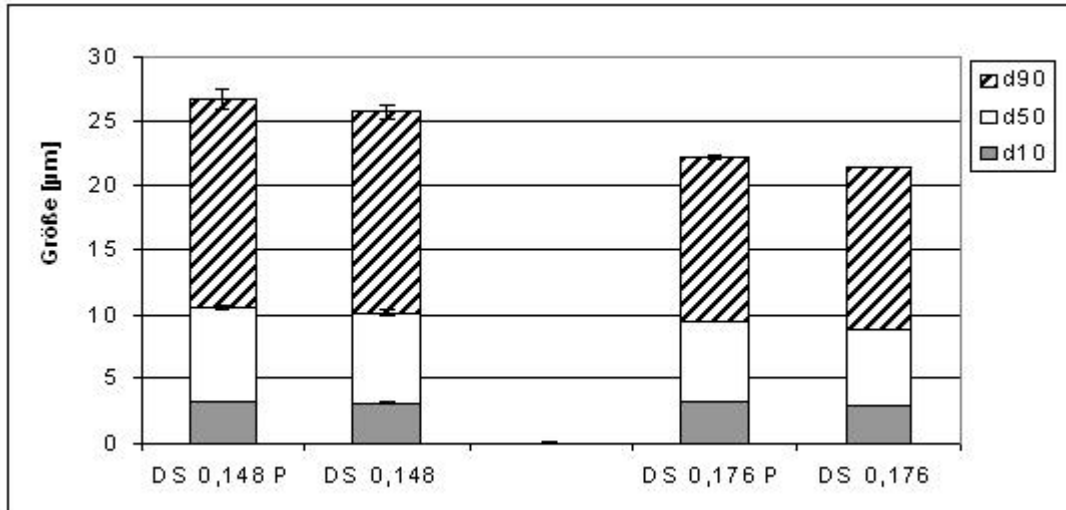
Unterschiedliche Netzwerkdichten führen zu verschiedenen Partikelgrößenverteilungen. Je dichter das Netzwerk, desto kleiner ist die durchschnittliche Partikelgröße und entsprechend enger ist die Verteilung (s. Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4: Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der Netzwerkdichte**



Vergleicht man Mikrosphären mit und ohne Proteinbeladung lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Partikelgrößenverteilung erkennen (s. Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5: Partikelgrößenverteilung von Mikrosphären der HES-HEMA mit einem DS von 0,148 und DS 0,176 mit Proteinbeladung (P) und ohne Proteinbeladung (Chromeon 494 Lysozym)**

Der Einfluss des DS auf die Partikelgrößenverteilung lässt sich dadurch erklären, dass bei der Ausbildung des Netzwerkes durch vermehrte Verknüpfungspunkte (hoher DS) ein engeres Netzwerk ausgebildet wird und die Polymerstränge dichter zusammen liegen als bei einem Netzwerk in dem nur wenige Knotenpunkte zwischen dem HES-Rückgrat geknüpft werden können.

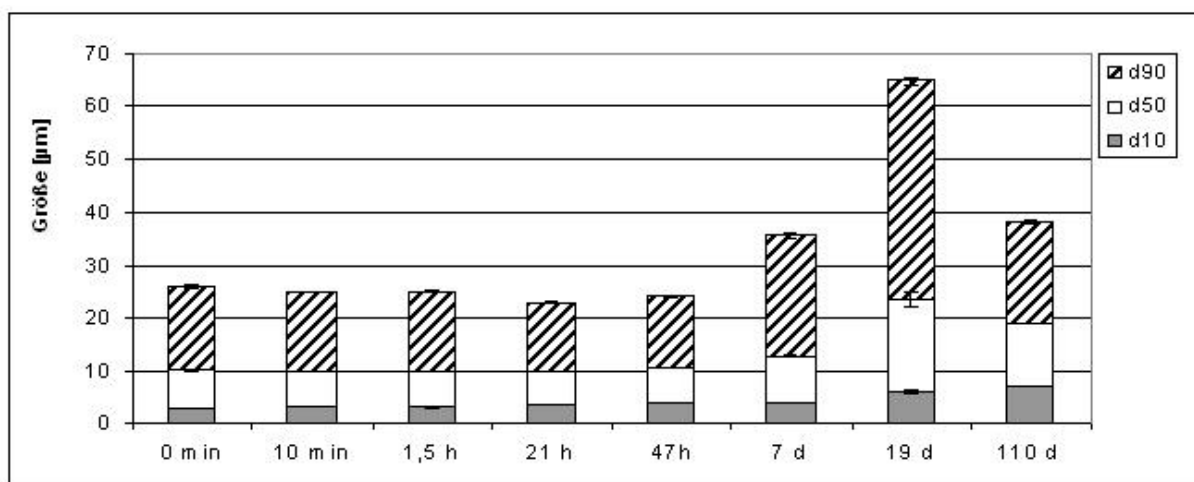
Dies wiederum hat eine direkte Auswirkung auf die Quellungseigenschaften. Ein größer geformtes Netzwerk lässt bei Wasseraufnahme eine größere Volumenzunahme zu als eines mit höherer Netzwerkdichte.

Generell beobachtet man bei den Quellungsmessen praktisch keine Veränderung der Verteilung der Partikelgröße bis 47 h Quellungszeit und anschließend eine Größenzunahme.

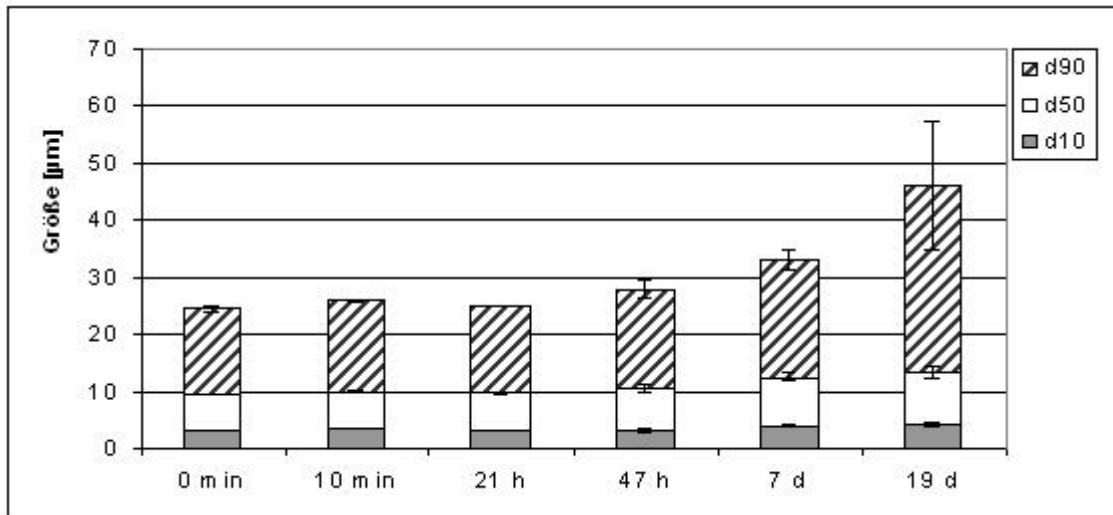
Vergleicht man die Abbildung 4.6 und 4.7 so ist eine starke Volumenzunahme nach 19 Tagen erreicht und der d90-Wert beträgt bei einem DS von 0,148 ca. 65 µm und bei dem DS 0,176 weniger als 50 µm.

Bei den Quellungsuntersuchungen erkennt man bis 47 h praktische keine Größenveränderung, tendenziell eher eine leichte Abnahme. In den ersten Stunden nach Suspension der trockenen Mikropartikel in Puffer können Agglomerate aus mehreren Mikropartikeln sich auftrennen, wodurch die Partikelgröße kleiner in der PIDS-Messung erscheint.

Die maximale Quellung, die festgestellt wurde, tritt am 19. Tag auf. Quellung tritt durch die Einlagerung von Wasser auf, wodurch die Polymerketten gestreckt werden und das Volumen der Partikel zunimmt. Zum anderen werden durch Degradation einige Vernetzungspunkte geöffnet und es kommt zu einer Vergrößerung der Maschenweite und dadurch bis zu einem gewissen Maße zu einer größeren Ausdehnung der Hydrogelpartikel. Eine fortgeschrittene Degradation der Mikropartikel erkennt man an der Verkleinerung der Mikropartikelgröße (s. Abbildung 4.6, 110 d). Des Weiteren verändert sich die Partikelgrößenverteilung bei der Degradation hin zu einer relativ schmalen Verteilung (s. Abbildung 4.6), da kleine Partikel aufgrund ihres großen Volumen-/ Oberflächenverhältnisses schneller abgebaut werden als große Partikel. Parallel zu diesem Vorgang findet auch der Abbau der größeren Partikel statt. Insgesamt nivellieren sich somit die Partikelgrößen.



**Abbildung 4.6:** Veränderung der Partikelgröße über die Zeit der Inkubation in Natriumphosphatpuffer bei 37 °C, HES-HEMA-Mikropartikel mit einem DS 0,148



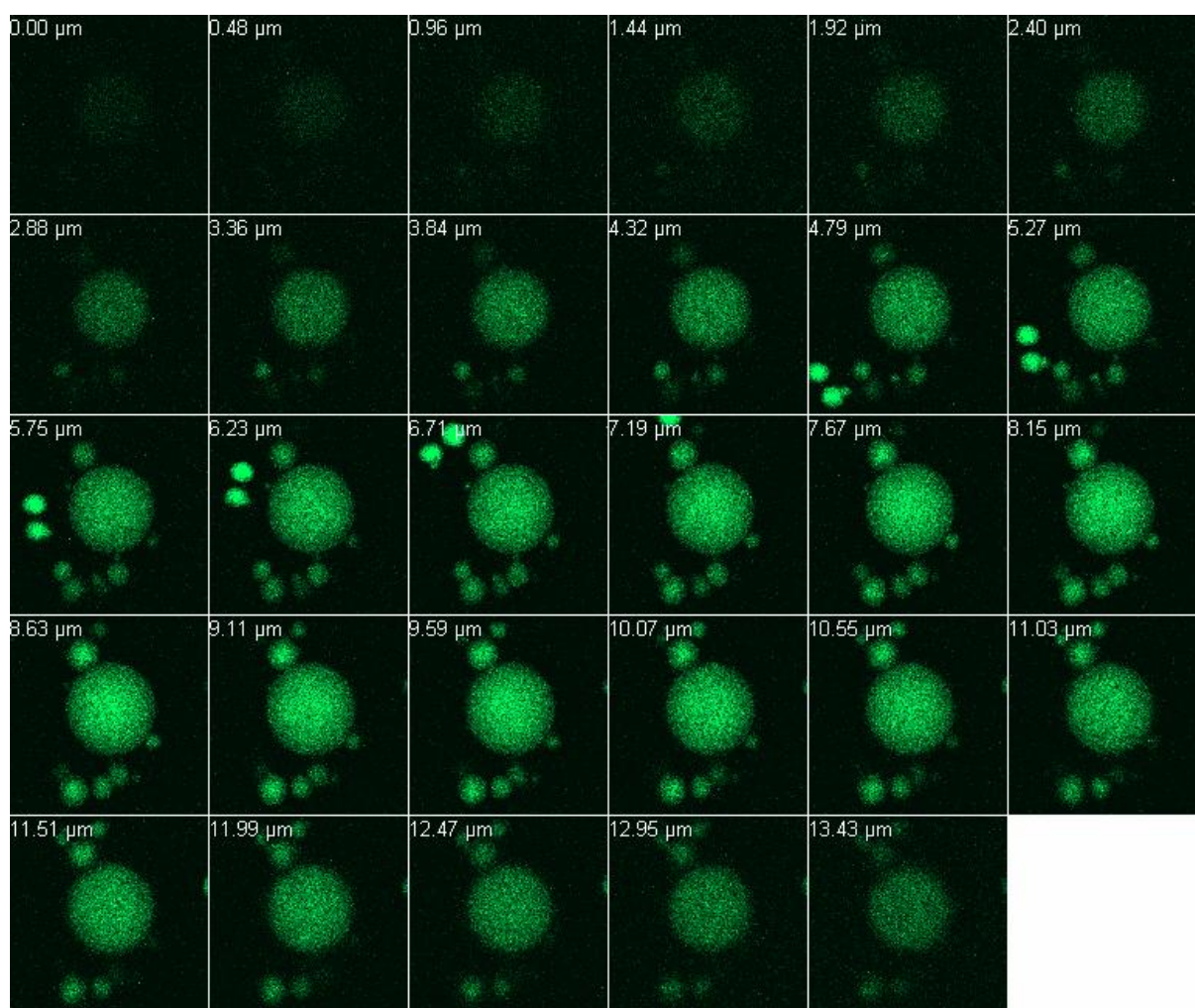
**Abbildung 4.7:** Veränderung der Partikelgröße über die Zeit der Inkubation in Natriumphosphatpuffer bei 37 °C, HES-HEMA-Mikropartikel mit einem DS 0,176

#### 4.1.3 Einschlusseffizienz

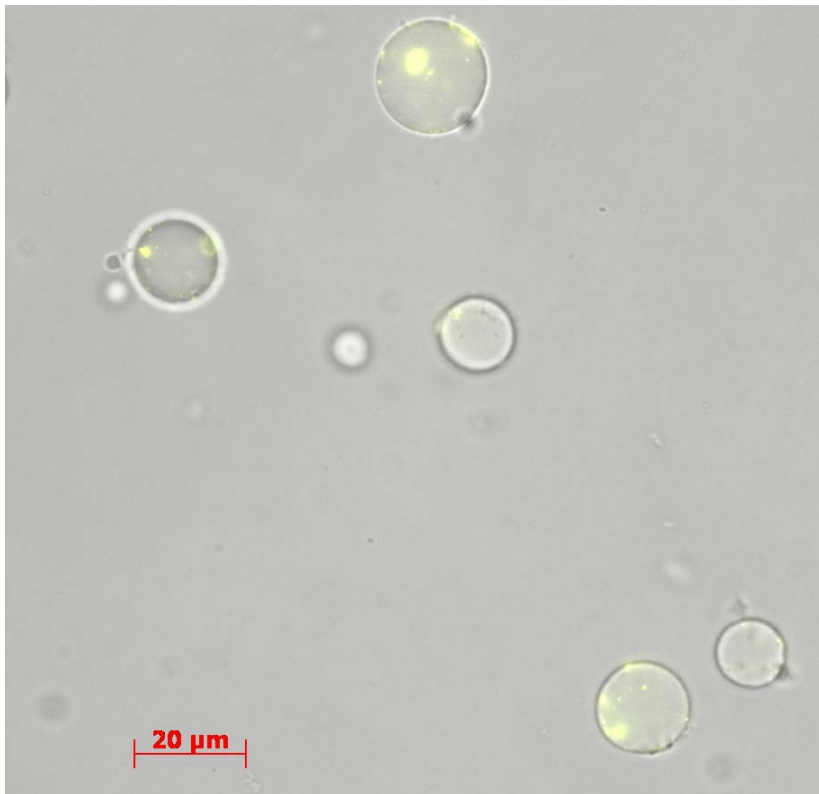
Die Einschlusseffizienz von Testsubstanzen und Proteinen liegt bei 44-68 %.

Bei FITC-Dextran liegt die Einschlusseffizienz bei 50 %  $\pm$  5,8 % und die Beladung der Partikel ist sehr gleichmäßig über den gesamten Partikel verteilt (s. Abbildung 4.8). Bei Chromeon-494-Lysozym ist das Lysozym eher in Clustern eingelagert (s. Abbildung 4.9). Diese unterschiedliche Verteilung lässt sich durch die unterschiedliche Grenzflächenaktivität der eingeschlossenen Substanzen erklären.

Der hydrophile Charakter des FITC-Dextrans führt zu einer gleichmäßigen Mischung mit der HES-HEMA-Phase. Lysozym ist dagegen mit seiner amphiphilen Struktur ebenso wie viele Proteine grenzflächenaktiv und lagert sich vermutlich mehr in Bereichen des Hydrogels mit Grenzflächen an [106], wie zum Beispiel am Übergang zwischen den wassergefüllten Poren und dem Hydrogel. Darüber hinaus hat die ausgeprägte Aggregationstendenz des Lysozyms einen Einfluss auf die Anordnung im Hydrogel.



**Abbildung 4.8: Konfokale laserlichtmikroskopische Aufnahme von FITC-Dextran beladenen Mikropartikeln**



**Abbildung 4.9: Konfokale laserlichtmikroskopische Aufnahme von Mikrosphären mit DS 0,05 und Chromeon-494-Lysozym**

**Tabelle 4.1: Einschlusseffektivität von Testsubstanzen in Mikrosphären in Prozent berechnet auf die eingesetzte Gesamtmenge**

<b>Testsubstanz</b>	<b>Einschlusseffektivität [%]</b>
FITC-Lysozym	$68 \pm 4$
FITC-Dextran	$50 \pm 6$
Chromeon-494-Lysozym	$62 \pm 7$
FITC-Anti-BSA	$44 \pm 13$

Die mittlere Einschlusseffizienz variiert bei den verschiedenen Testsubstanzen aufgrund der Anreicherung in der HES-HEMA Phase und der unterschiedlichen Stabilität der Testsubstanzen (Antikörper) (s. Tabelle 4.1).

Die Daten, die in den Versuchen zur Einschlusseffizienz ermittelt wurden, zeigen keinen signifikanten Trend bei verschiedenen Netzwerkichten. Beispielhaft ist dies für den Einschluss von Chromeon-494-Lysozym in Hydrogelmikrosphären aufgeführt (s. Tabelle 4.2)

**Tabelle 4.2: Einschlusseffektivität von Lysozym in Mikrosphären mit variierenden DS in Prozent berechnet auf die eingesetzte Gesamtmenge**

<b>DS</b>	<b>Einschlusseffektivität Von Chromeon-494-Lysozym [%]</b>
0,055	69
0,069	58
0,149	70
0,176	53

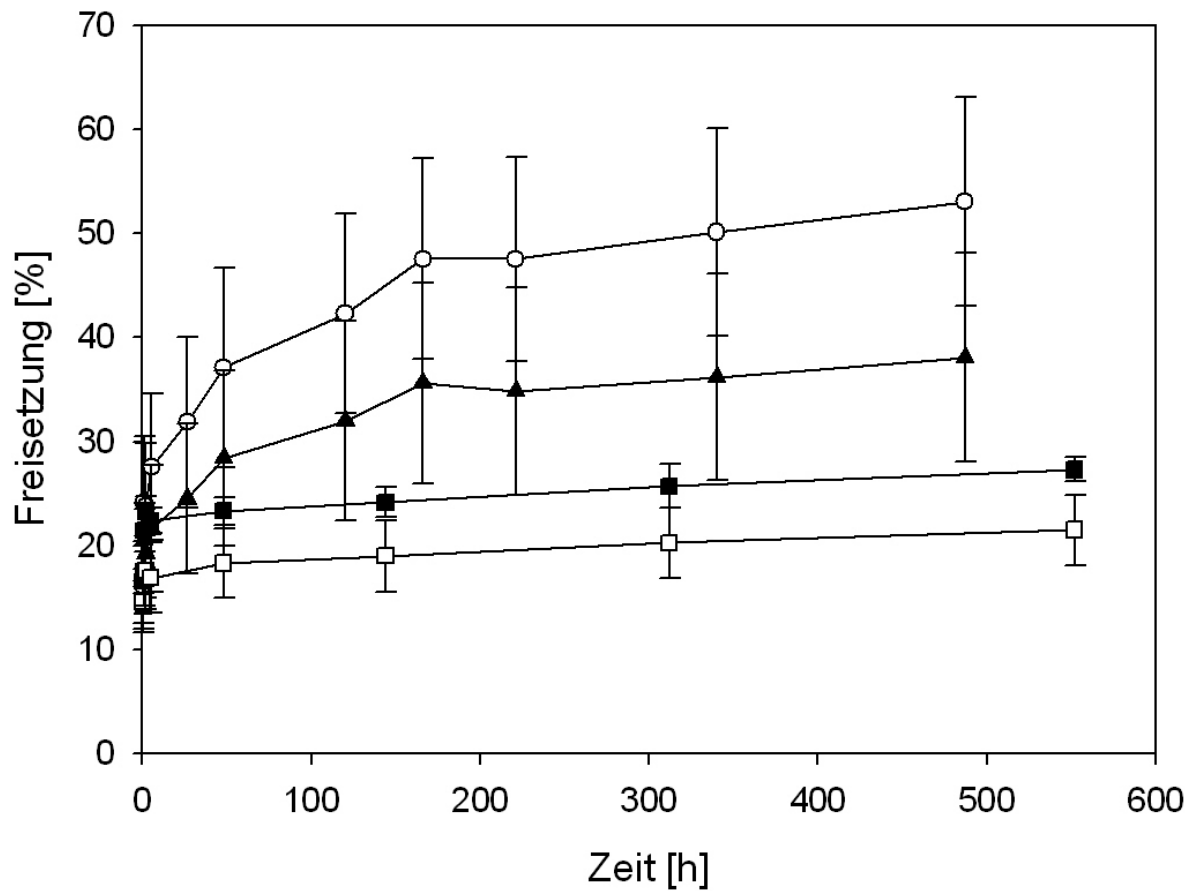
## 4.2 Freisetzung aus Hydrogelen

### 4.2.1 Einfluss der Netzwerkichte

Für diese Untersuchung wurde Chromeon-494-Lysozym in Mikrosphären eingeschlossen. Die HES-HEMA-Chargen zur Mikrosphärenherstellung unterschieden sich in ihrem DS (0,055, 0,069, 0,149 und 0,176). Die Freisetzung wurde mit Natriumphosphatpuffer pH 7 als Akzeptormedium durchgeführt.

In Abbildung 4.10 erkennt man eine deutliche Abhängigkeit der Freisetzung von der Netzwerkichte. Eine höhere Netzwerkichte führt zu einer stark retardierten Freisetzung, während mit abnehmenden DS die Freisetzung schneller erfolgt.

Die Standardabweichungen sind bei den niedrigeren DS höher als bei den höheren DS-Werten.

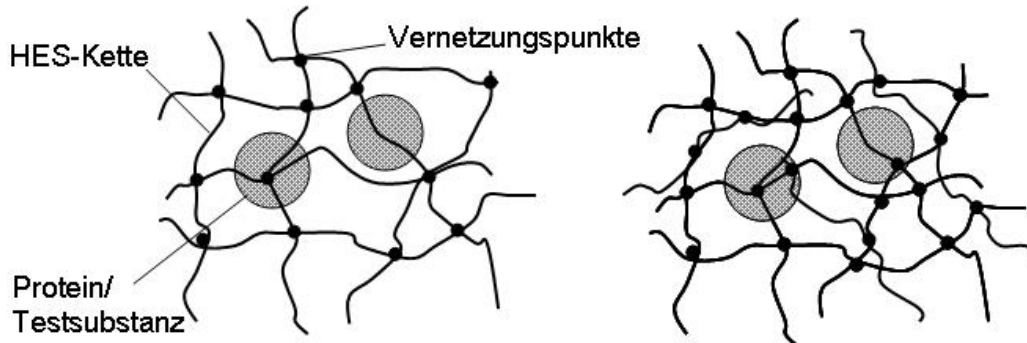


**Abbildung 4.10:** Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Lysozym aus HES-HEMA-Mikrosphären mit verschiedenen DS: ○ DS 0,055; ▲ DS 0,069; ■ DS 0,149; □ DS 0,176

Ein niedriger DS hat nur wenige HEMA-Seitengruppen, die zur Ausbildung von Knotenpunkten zwischen den HES-Polymeren zur Verfügung stehen. Dadurch entsteht ein weniger definiertes und eher zufällig verknüpftes Netzwerk. Die Reproduzierbarkeit der Chargen ist in diesem DS-Bereich unzureichend. Für eine gut vorhersehbare Freisetzung sind die niedrig vernetzten Hydrogele somit weniger gut geeignet.

Je poröser das Netzwerk desto weniger ist die Diffusion des Lysozyms behindert. Die Porosität verhält sich im Fick'schen Gesetz für diffusionskontrollierte Freisetzung

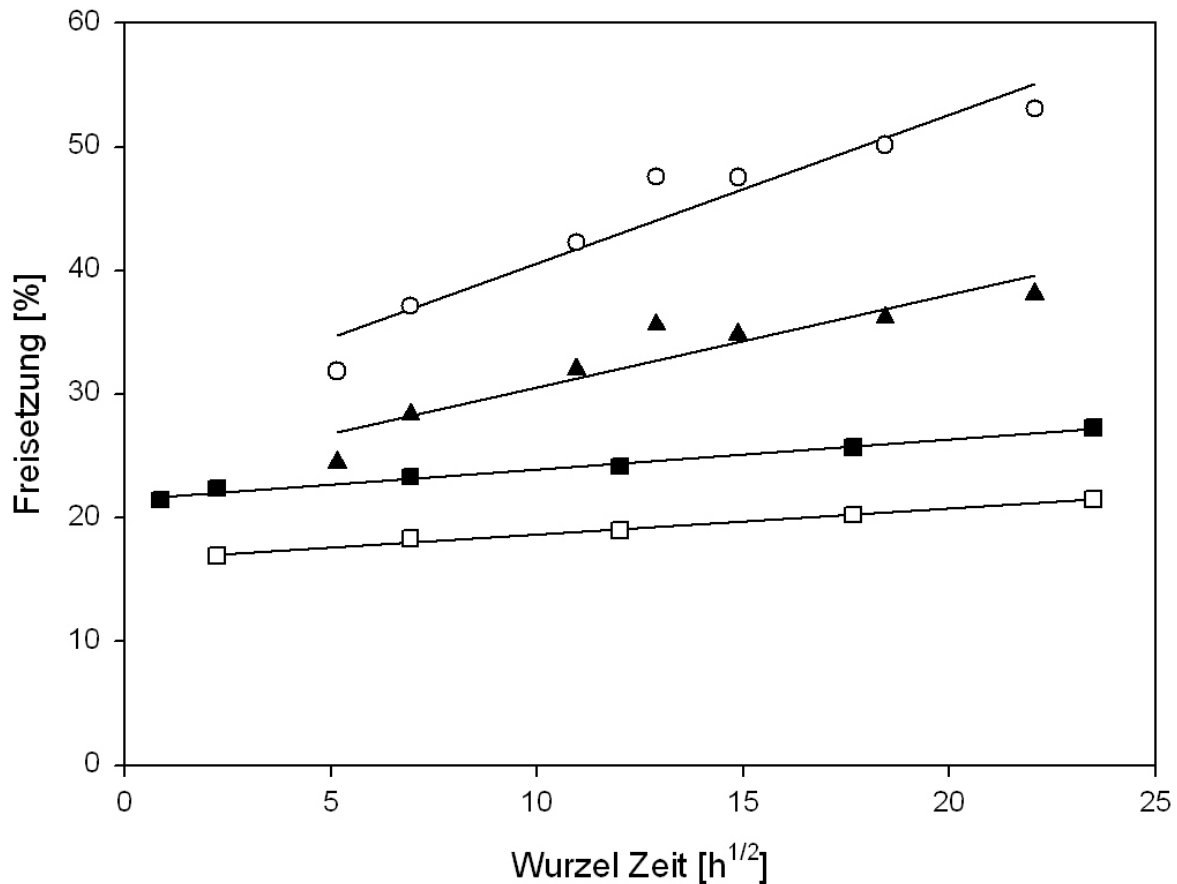
proportional zum Diffusionskoeffizient (s. Absatz 2.1.2). Schematisch lässt sich dies durch Abbildung 4.11 verdeutlichen.



**Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Netzwerkdichte; links niedrige Netzwerkdichte (kleiner DS-Wert); rechts hohe Netzwerkdichte (großer DS-Wert)**

Die nach der initialen Freisetzung freigesetzte Substanzmenge in Prozent lässt sich zum Bestimmen des Diffusionskoeffizienten gegen die Wurzel der Zeit auftragen (s. Abbildung 4.12), dies gilt für den linearen Bereich des Freisetzungsverlaufes. Hierbei erhält man aus der Steigung der Geradengleichung den Wert für den Diffusionskoeffizienten und aus dem Achsenabschnitt eine Aussage über den initial freigesetzten Anteil des Wirkstoffes (s. Tabelle 4.3).





**Abbildung 4.12:** Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Lysozym aus HES-HEMA Mikrosphären mit verschiedenen DS: ○ DS 0,055; ▲ DS 0,069; ■ DS 0,149; □ DS 0,176 in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit

**Tabelle 4.3:** Diffusionskoeffizient von fluoreszenzmarkiertem Lysozym aus HES-HEMA-Mikrosphären mit unterschiedlichen DS

DS	Geradengleichung aus Abbildung 4.12	Diffusions- koeffizient	Initiale Freisetzung [%]	Bestimmtheits- grad $R^2$
0,055	$y = 1,3141x + 26,749$	1,314	26,75	0,9395
0,069	$y = 0,8427x + 21,539$	0,843	21,54	0,9041
0,149	$y = 0,2419x + 21,504$	0,242	21,50	0,9883
0,176	$y = 0,2088x + 16,595$	0,209	16,60	0,9917

Aus den Diffusionskoeffizienten der Tabelle 4.3 erkennt man, dass mit zunehmenden DS der Diffusionskoeffizient sowie der prozentuale initial freigesetzten Wirkstoffanteil abnehmen. Die Freisetzung verläuft also langsamer. Bei einem hohen DS-Wert sind

diese Unterschiede im Diffusionskoeffizient allerdings minimal. Die beiden hohen Netzwerkichten unterscheiden sich also hauptsächlich in der Ausprägung des Burst-Releases, der durch das Vorhandensein von Bereichen mit größeren Poren zustande kommt. Die Netzwerkstruktur der beiden Hydrogele (DS 0,149 und 0,176) außerhalb der größeren Poren ist also vergleichbar.

#### **4.2.2 Vergleich Hydrogelzylinder und Mikrosphären**

Die Freisetzung von Lysozym aus Hydrogelzylindern erfolgt ebenso in Abhängigkeit des DS, je kleiner der DS umso schneller die Freisetzung.

Die Testsubstanz wird aus dem Gelzylinder sehr viel schneller freigesetzt als aus den Mikrosphären (s. Abbildung 4.13). Das Volumen/Oberflächenverhältnis würde jedoch bei Mikrosphären eine schnellere Freisetzung erwarten lassen.

Hier spielt aber wahrscheinlich die Schichtdicke der Gele und deren Aufarbeitung eine Rolle. Die Schichtdicke ist bei den Hydrogelmikropartikeln wesentlich geringer. Sie werden über den gesamten Durchmesser belichtet und können dadurch eine stärkere Vernetzung ausbilden. Die Hydrogelzylinder wurden ohne Aufreinigung und Gefriertrocknung in den Freisetzungsversuchen eingesetzt, wodurch sie in einem gut hydratisierten Zustand vorlagen. Dadurch ist die Diffusion des eingeschlossenen Lysozyms aus dem Gel mit Beginn der Freisetzungsversuche erleichtert.

Versuche mit gefriergetrockneten Hydrogelzylindern scheiterten in dieser Arbeit an der fehlenden Stabilität der Zylinder nach erneutem Benetzen.

Zudem kann das Lysozym an der Oberfläche des Gels haften und auf diese Weise schnell an das Akzeptormedium abgegeben werden, während es bei den Partikeln nach Aufreinigung zu einem großen Teil bereits abgewaschen war.

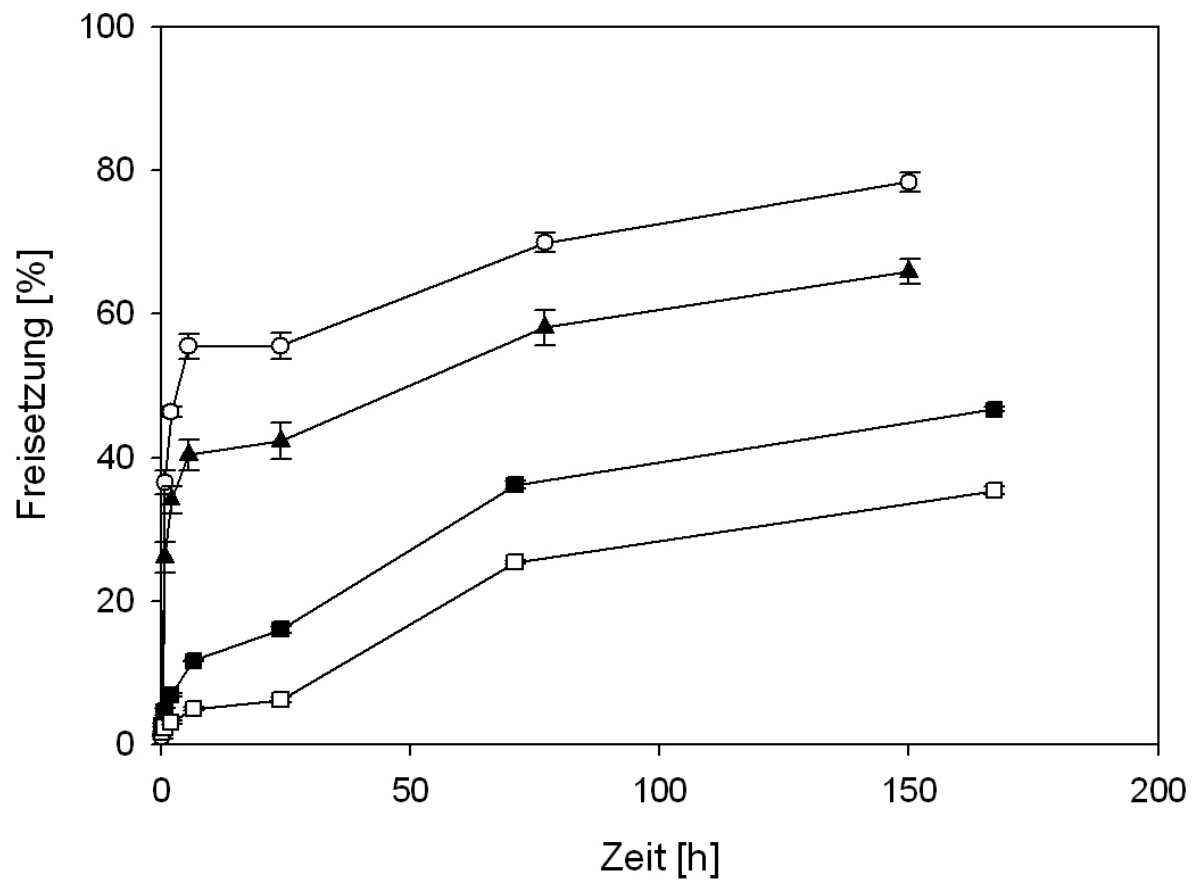
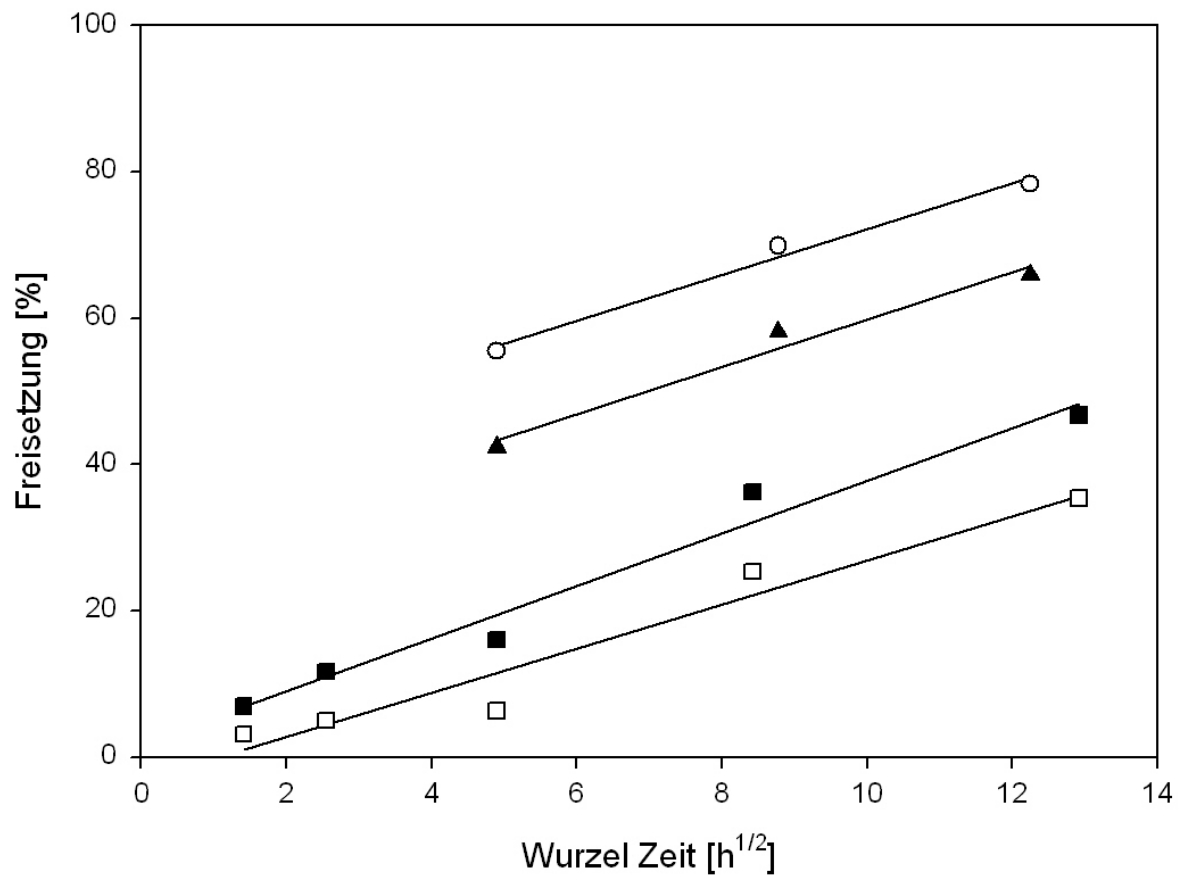


Abbildung 4.13: Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Lysozym aus Hydrogelzylindern mit verschiedenen DS: ○ DS 0,055; ▲ DS 0,069; ■ DS 0,149; □ DS 0,176



**Abbildung 4.14:** Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Lysozym aus Hydrogelzylindern mit verschiedenen DS: ○ DS 0,055; ▲ DS 0,069; ■ DS 0,149; □ DS 0,176 in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit

**Tabelle 4.4:** Diffusionskoeffizient von fluoreszenzmarkiertem Lysozym aus HES-HEMA-Mikrosphären mit unterschiedlichen DS

DS	Geradengleichung aus Abbildung 4.14	Diffusions- koeffizient	Initiale Freisetzung [%]	Bestimmtheits- grad R <sup>2</sup>
0,055	$y = 3,1148x + 41,012$	3,115	41,01	0,9866
0,069	$y = 3,2261x + 27,556$	3,226	27,56	0,9738
0,149	$y = 3,5981x + 1,7717$	3,598	1,77	0,9734
0,176	$y = 3,0118x - 3,1717$	3,012	- 3,17	0,9493

Aus den Werten für die Initiale Freisetzung (s. Tabelle 4.4) erkennt man, dass mit zunehmenden DS der initial freigesetzten Wirkstoffanteil abnimmt. Die Diffusionskoeffizienten unterscheiden sich bei unterschiedlichen DS hingegen nur

geringfügig von einander. Diese Tatsache bestätigt die Vermutung, dass die Hydrogelzylinder im Vergleich zu den Mikrosphären aufgrund ihrer großen Schichtdicke nicht vollständig durchpolymerisieren. Dadurch unterscheiden sich die Zylinder mit verschiedenen DS hauptsächlich im äußeren Bereich der Zylinder, in diesem Bereich sind alle zur Verfügung stehenden Vernetzungspunkte verbunden worden. Das Lysozym aus dem äußeren Bereich der Zylinder wird mit zunehmenden DS langsamer freigesetzt. Ist die Freisetzung aus dem Bereich abgeschlossen, folgt die Freisetzung aus den inneren Bereichen. Durch eine nicht vollständige Vernetzung unterscheidet sich dieser Bereich bei variierenden DS nicht und der Diffusionskoeffizient ist bei verschiedenen DS sehr ähnlich.

#### **4.2.3 Eingeschlossene Testsubstanz mit unterschiedlicher Molekulargröße**

Um das Hydrogelnetzwerk noch näher zu charakterisieren, wurden FITC-Dextrane mit unterschiedlichen Molekülgrößen (20 kDa, 70 kDa und 500 kDa) in unterschiedlich stark vernetzte Hydrogele eingeschlossen und auf ihre Freisetzungseigenschaften untersucht. Die Freisetzung aus dem Hydrogel verlangsamt sich erwartungsgemäß mit zunehmender Molekülgröße des FITC-Dextrans (s. Abbildung 4.15 und 4.16). Diesen Trend kann man bei beiden eingesetzten Netzwerkichten (DS 0,055 und DS 0,22) beobachten, wobei eine erhöhte Netzwerkichte zu einer verzögerter Freisetzung führt.

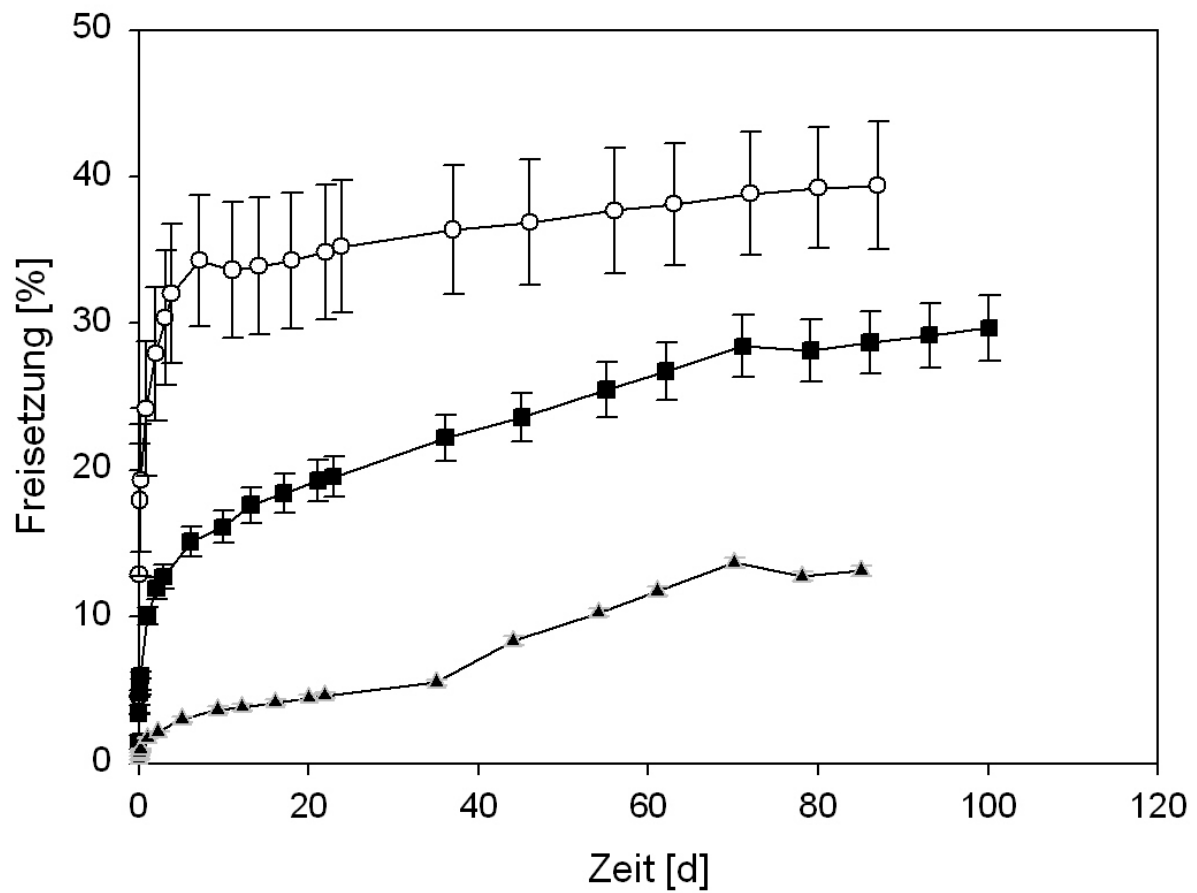
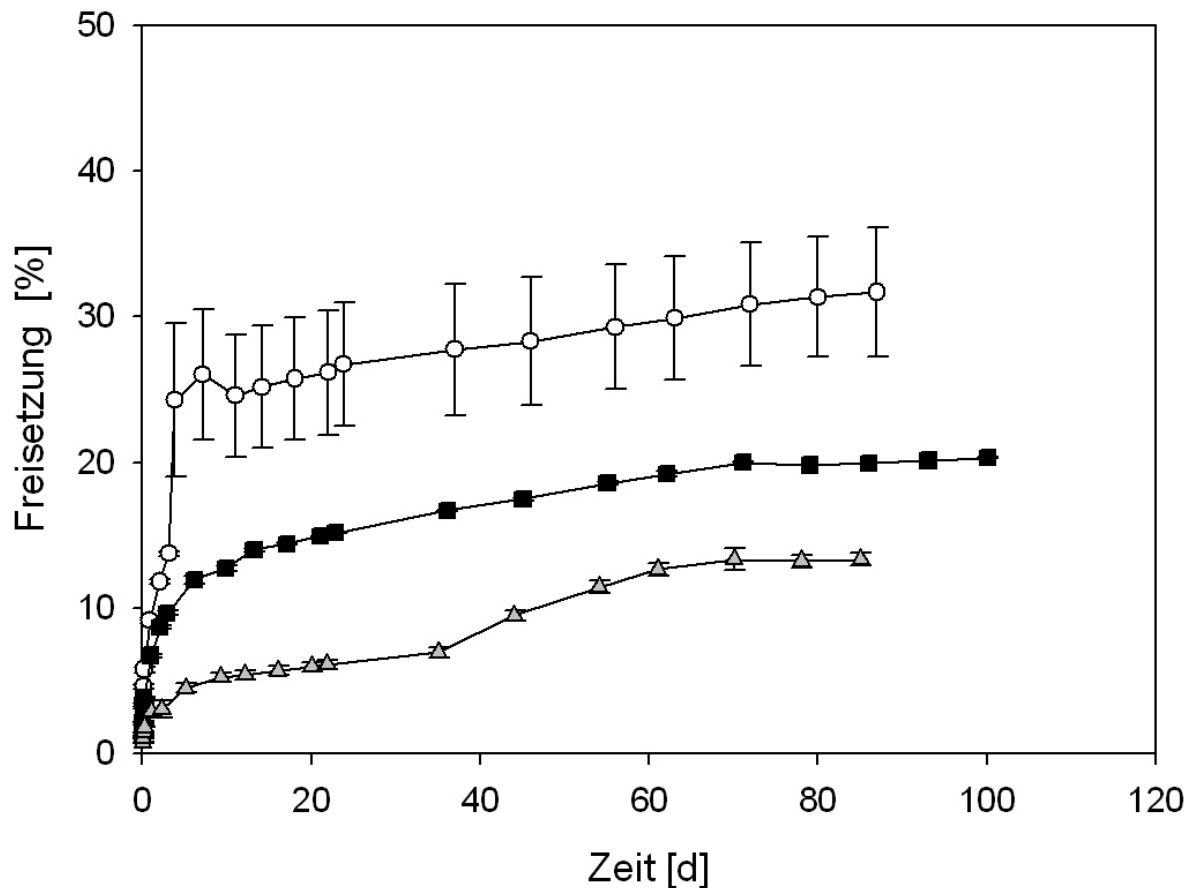


Abbildung 4.15: Freisetzung von FITC-Dextranen mit verschiedenen Molekulargrößen aus Mikrosphären mit einem DS von 0,055 beladen mit: ○ FITC-Dextran mit Mw 20 kDa; ■ FITC-Dextran mit Mw 70 kDa; ▲ FITC-Dextran mit Mw 500 kDa



**Abbildung 4.16:** Freisetzung von FITC-Dextranen mit verschiedenen Molekulargrößen aus Mikrosphären mit einem DS von 0,22: ○ FITC-Dextran mit Mw 20 kDa; ■ FITC-Dextran mit Mw 70 kDa; ▲ FITC-Dextran mit Mw 500 kDa

Neben der Freisetzungsgeschwindigkeit ist auch der Verlauf der Freisetzung für die Netzwerkcharakteristik von Bedeutung, vor allem das Verhältnis zwischen initial und retardiert freigesetzten Testsubstanzen (z.B. FITC-Dextran).

Bei allen getesteten Formulierungen war ein biphasischer Verlauf zu erkennen, hierzu wurde der initial und der verzögert freigesetzte Anteil aus den Grafiken abgelesen.

Das Verhältnis zwischen initialem und retardiertem Freisetzen unterscheidet sich bei den zwei untersuchten Netzwerkdichten vor allem in der Freisetzung von FD 70 (s. Abbildung 4.15 und 4.16). Das Dextran mit der molaren Masse von 500 kDa wird zu etwa 1,7 % initial aus Hydrogelmikropartikeln mit einem DS 0,05

freigesetzt, während Dextran mit 70 kDa zu 15 % und Dextran mit 20 kDa zu 32 % initial freigegeben wird.

Bei einer Netzwerkdicke von 0,22 verändert sich die initiale Freisetzung bei Dextran 500 auf 1,8 %, FD 70 kDa auf 11 % und FD 20 auf 25 %

Die initiale Freisetzung tritt auf, wenn der hydrodynamische Durchmesser der eingeschlossenen Testsubstanz kleiner ist als der Durchmesser der Poren des Hydrogels und die Substanz somit das Gel über Diffusionsvorgänge verlassen kann [10, 56, 57].

Der hydrodynamische Durchmesser von Dextran lässt sich über die Berechnung von Vollmert ermitteln [107, 108], wonach Dextran mit 500 kDa eine Größe von 17,8 nm besitzt; Dextran mit 70 kDa eine Größe von 6,6 nm und Dextran mit 20 kDa eine Größe von 3,6 nm (s. Tabelle 4.5).

Demnach unterscheiden sich die Netzwerke bei den Hydrogelen mit DS 0,05 und 0,22 vor allem in dem Vorhandensein von Poren der Größen im Bereich von 3-7 nm, während nur 1,7 % beziehungsweise 1,8 % der Poren größer als 17,8 nm sind.

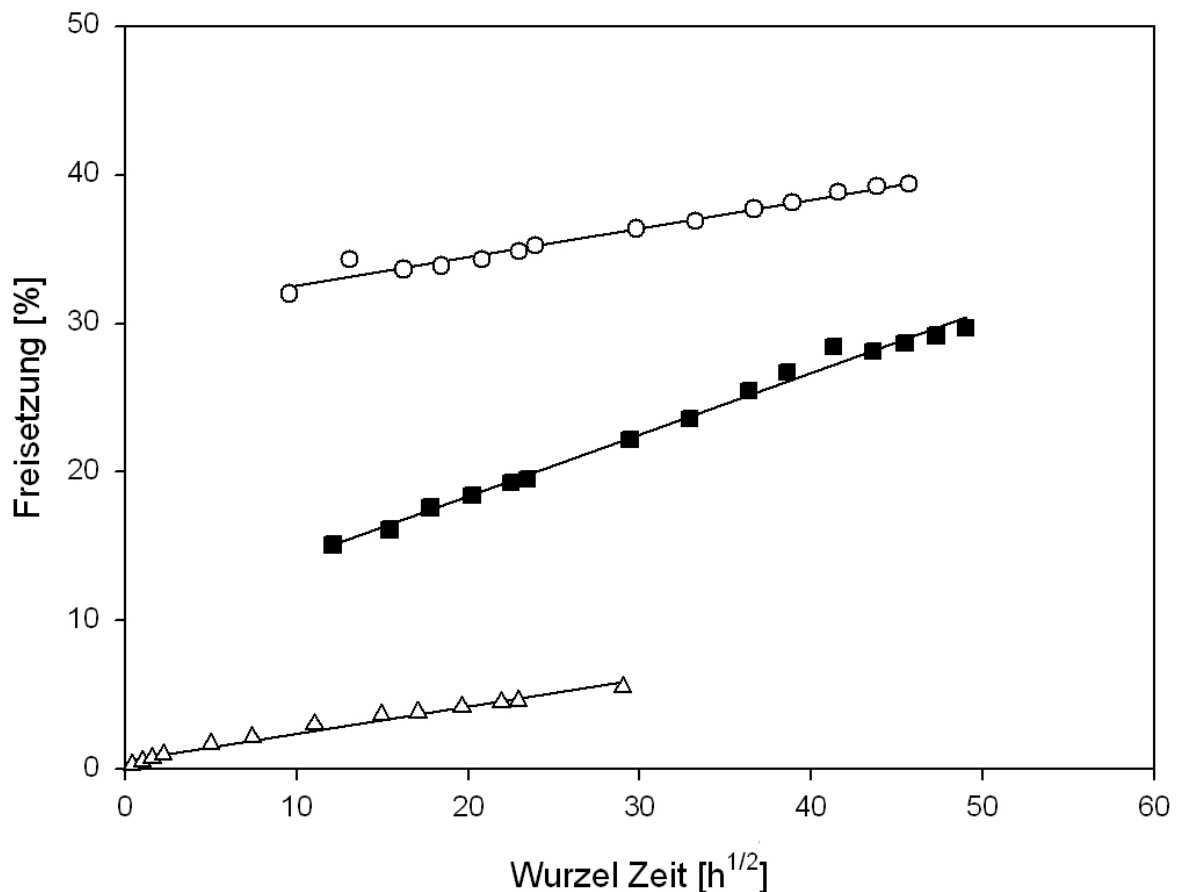
Schaut man sich auch den retardierten Freisetzungsbereich nach 4 Tagen an, erkennt man den größten Unterschied zwischen den beiden Netzwerkdichten wiederum im Verlauf der Freisetzung des FD 70 kDa. Diese Freisetzung erreicht bei den Partikeln aus dem Polymer mit dem DS 0,05 nach 90 Tagen einen Wert von 30 % freigesetzten Dextran, während der Wert bei dem DS 0,22 bei 20 % liegt. Diesen Unterschied kann man durch Quellung und Abbau des Netzwerkgerüsts erklären, wodurch mehr Poren im Größenbereich von 6-7 nm entstehen.

**Tabelle 4.5: Initiale FITC-Dextran Freisetzung im Vergleich zum hydrodynamischen Durchmesser**

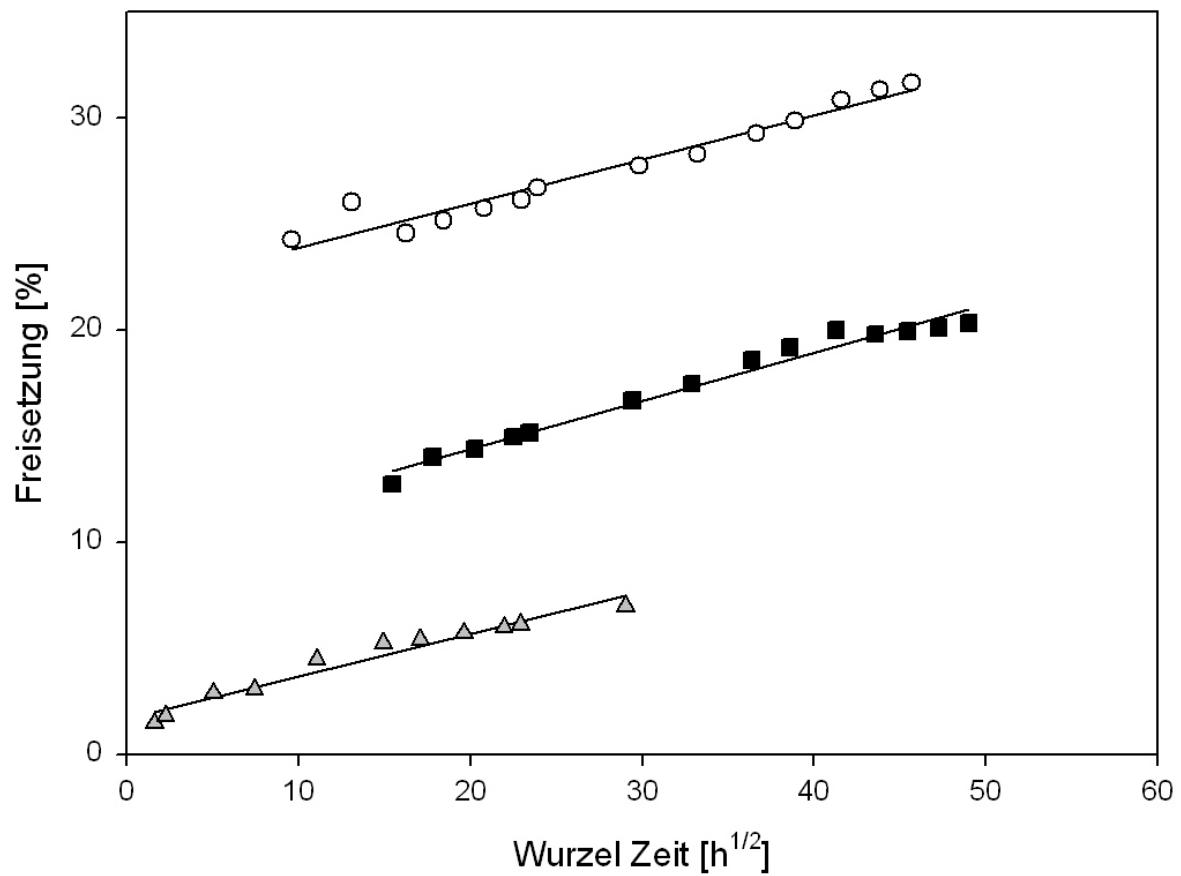
<b>FITC-Dextran Molekülgröße [kDa]</b>	<b>Hydrodynamischer Durchmesser [nm]</b>	<b>DS 0,05 Initiale Freisetzung [%]</b>	<b>DS 0,22 Initiale Freisetzung [%]</b>
500	17,8	1,7	1,8
70	6,6	15	11
20	3,6	32	25



Trägt man den linearen Bereich des prozentuell freigesetzten Anteil an FITC Dextran aus Mikrosphären mit einem DS 0,05 und 0,22 gegen die Wurzel der Zeit auf und ermittelt dadurch den initial freigesetzten Anteil und den Diffusionskoeffizienten erhält man einen ganz ähnlichen Trend.



**Abbildung 4.17:** Freisetzung von FITC-Dextranen mit verschiedenen Molekulargrößen aus Mikrosphären mit einem DS von 0,055 beladen mit: ○ FITC-Dextran mit Mw 20 kDa; ■ FITC-Dextran mit Mw 70 kDa; ▲ FITC-Dextran mit Mw 500 kDa in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit



**Abbildung 4.18:** Freisetzung von FITC-Dextranen mit verschiedenen Molekulargrößen aus Mikrosphären mit einem DS von 0,22: ○ FITC-Dextran mit Mw 20 kDa; ■ FITC-Dextran mit Mw 70 kDa; ▲ FITC-Dextran mit Mw 500 kDa in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit

**Tabelle 4.6** Diffusionskoeffizient von FITC-Dextran aus HES-HEMA-Mikrosphären mit unterschiedlichen DS

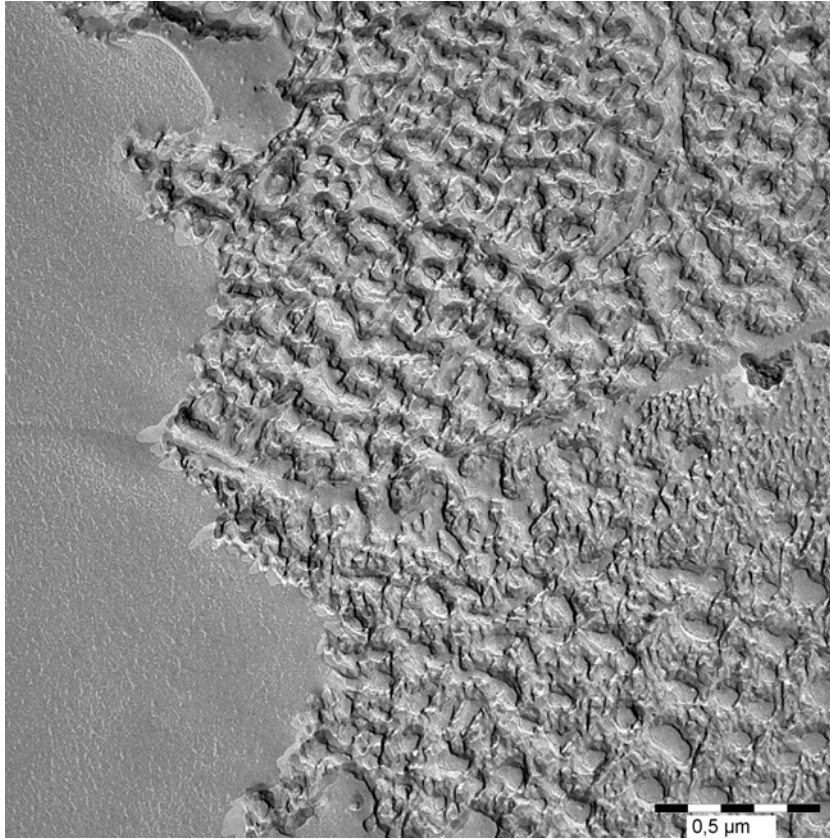
<b>System</b>	<b>Geradengleichung aus Abbildungen 4.17 und 4.18</b>	<b>Diffusions- koeffizient</b>	<b>Initiale Freisetzung [%]</b>	<b>Bestimmtheits- grad <math>R^2</math></b>
DS 0,05 FD 20	$y = 0,1943x + 30,569$	0,194	30,57	0,974
DS 0,22 FD20	$y = 0,2081x + 21,826$	0,208	21,83	0,950
DS0,05 FD70	$y = 0,416x + 10,030$	0,416	10,03	0,992
DS0,22 FD70	$y = 0,2336x + 9,6191$	0,234	9,62	0,978
DS0,05 FD500	$y = 0,1810x + 0,5987$	0,181	0,60	0,980
DS0,22 FD500	$y = 0,1997x + 1,6915$	0,200	1,69	0,957

Die in Tabelle 4.6 aufgeführten Diffusionskoeffizienten bei der Freisetzung von FD 70 zeigen den größten Unterschied zwischen den Hydrogelen mit einem DS 0,05 und 0,22. Bei der initialen Freisetzung sind die Werte und Tendenzen den oben genannten ähnlich. Große Unterschiede treten nach dieser Ermittlung zwischen den beiden Netzwerkichten bei der Freisetzung von Molekülen mit einer Größe von 7-18 nm auf.

Dieses Verhalten resultiert aus dem besonderen Aufbau des Hydrogels.

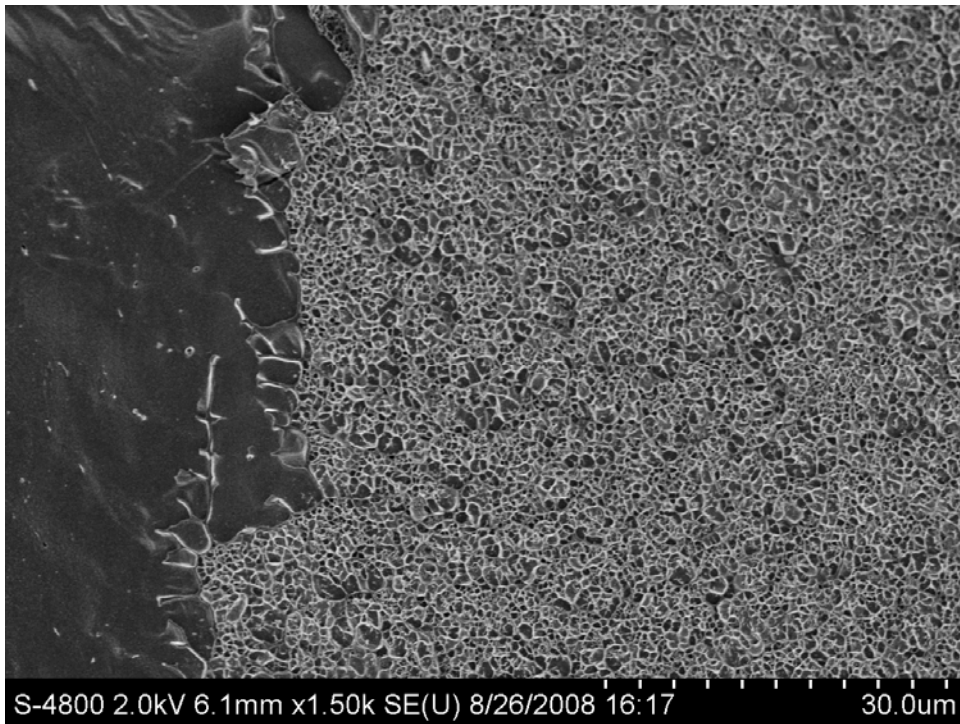
Der Aufbau des Netzwerks, der aus relativ großen Poren und höher vernetzten Bereichen besteht, lässt sich durch eine auftretende Phasenseparation während der Vernetzung erklären [9]. Das Netzwerk kann sich bis zu einer gewissen Molekülgröße ausbilden und fällt ab Erreichen der Löslichkeitsgrenze aus. Dadurch erhält das Gel eine kanalartige Porenstruktur. Diesen Aufbau kann man auch in TEM und SEM-Aufnahmen in Abbildung 4.19 und 4.21 von gefriergebrochenen

Hydrogelproben erkennen. Die Mehrzahl der Lamellen haben eine Dicke unter 100 nm.

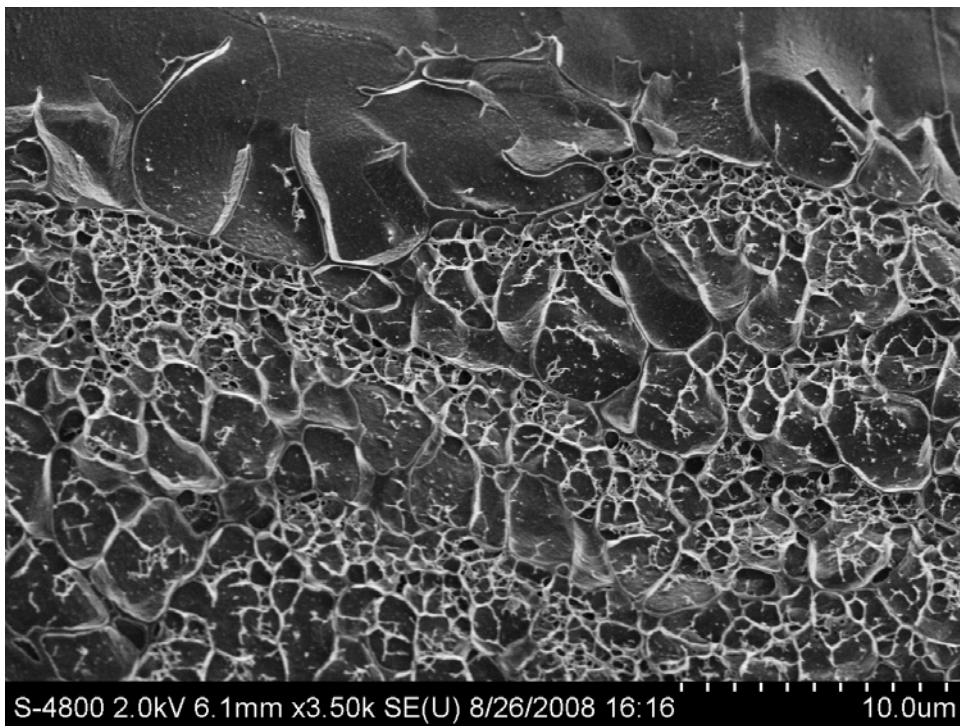


**Abbildung 4.19: TEM Aufnahme einer gefriergebrochenen Mikrosphärenprobe, Quelle: Dissertation Kristin Scheibe [36]**

a

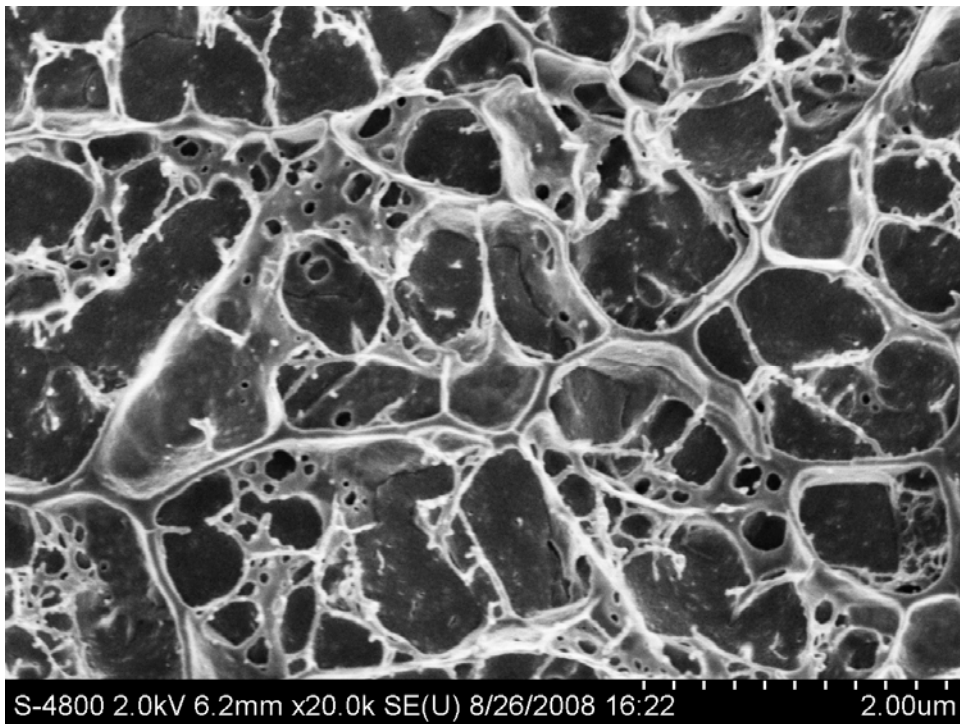


b

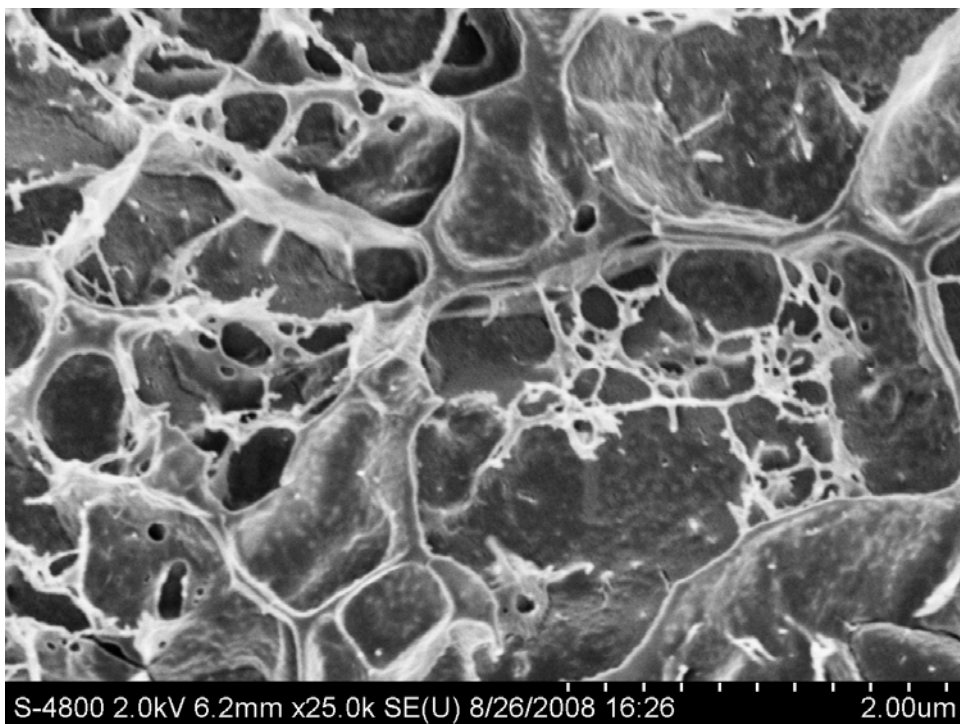


**Abbildung 4.20: SEM-Aufnahmen von gefriergebrochenen Hydrogelen bei zunehmender Vergrößerung (von a-d (s. folgende Seite)) (DS 0,077)**

c



d



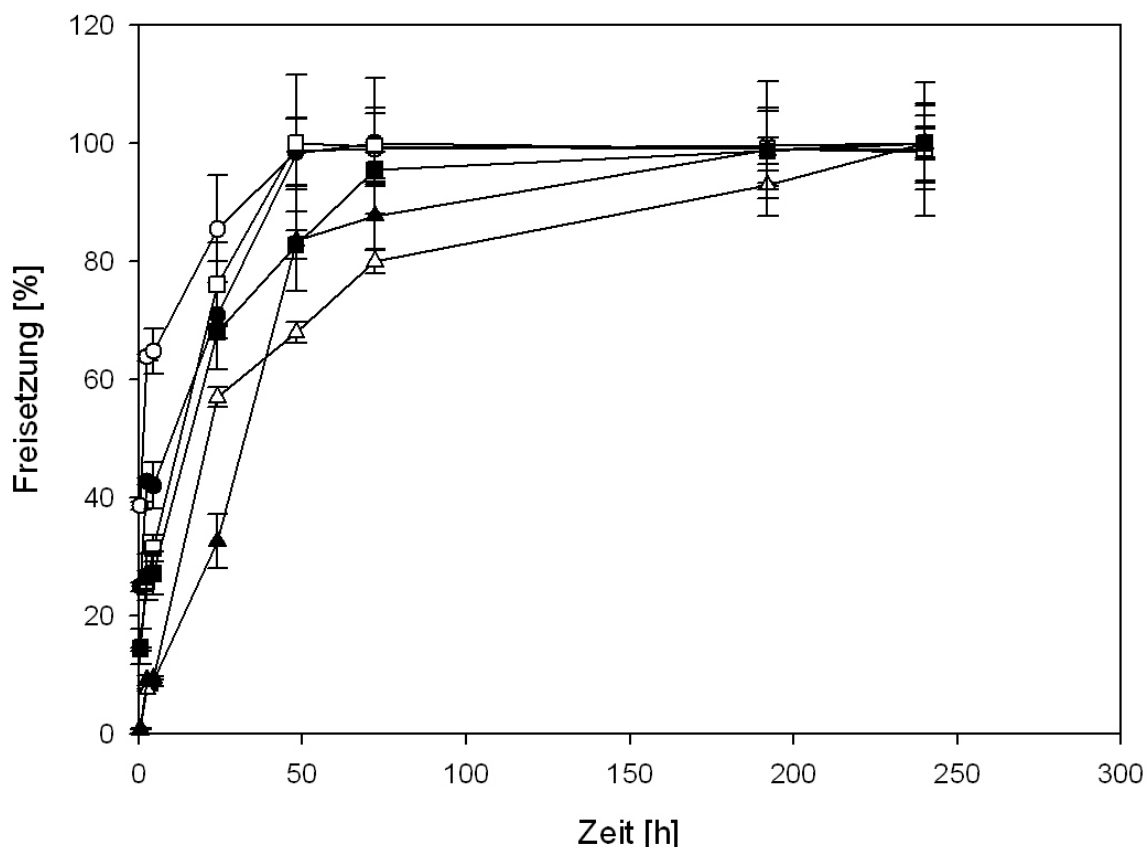
**Abbildung 4.21: SEM-Aufnahmen von gefriergebrochenen Hydrogelen bei zunehmender Vergrößerung (von a-d(s. vorherige Seite)) (DS 0,077)**

#### 4.2.4 Freisetzung bei Einsatz verschiedener Akzeptormedien

Der Einfluss des Akzeptormediums auf das Freisetzungsverhalten wurde mit alkalischem Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) und humanem Serum untersucht und diese Ergebnisse in Bezug zu den Daten in Natriumphosphatpuffer pH 7 gesetzt.

In Natriumcarbonatpuffer verläuft die Freisetzung aus den beiden Mikrosphärenchargen (DS 0,05 und 0,22) bei allen drei FITC-Dextranen (20 kDa; 70 kDa; 500 kDa) wesentlich schneller als in Natriumphosphatpuffer und ist nach maximal 250 Stunden beendet (s. Abbildung 4.22).

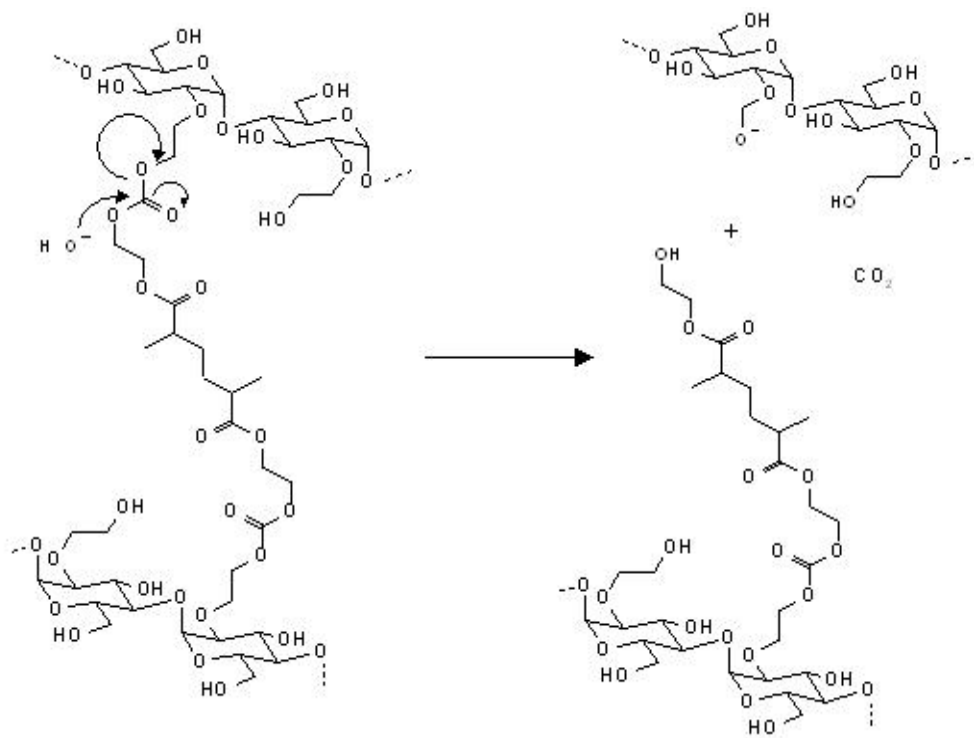
Die Freisetzung verläuft wieder mit zunehmender Molekülgröße des FITC-Dextrans langsamer. Vergleicht man FITC-Dextran 70 kDa eingeschlossen in verschiedene HES-HEMA Hydrogele, so ist die Retention in dem höher vernetzten Hydrogel verstärkt.



**Abbildung 4.22:** Freisetzung von FITC-Dextranen aus Mikrosphären mit DS 0,055 und 0,22 in einem Akzeptormedium pH 9,6: ○DS 0,055, FITC-Dextran 20 kDa; ● DS 0,22, FITC-Dextran 20 kDa; □ DS 0,055, FITC-Dextran 70 kDa; ■ DS 0,22, FITC-Dextran 70 kDa; △ DS 0,055, FITC-Dextran 500 kDa; ▲ DS 0,22, FITC-Dextran 500 kDa

Die beschleunigte Freisetzung in einem alkalischen Akzeptormedium kann durch die Hydrolyse der Carbonatesterstruktur erklärt werden [109].

Hierbei wird die hydrolyselabile Kohlensäureestergruppe irreversibel gespalten (s. Abbildung 4.23).

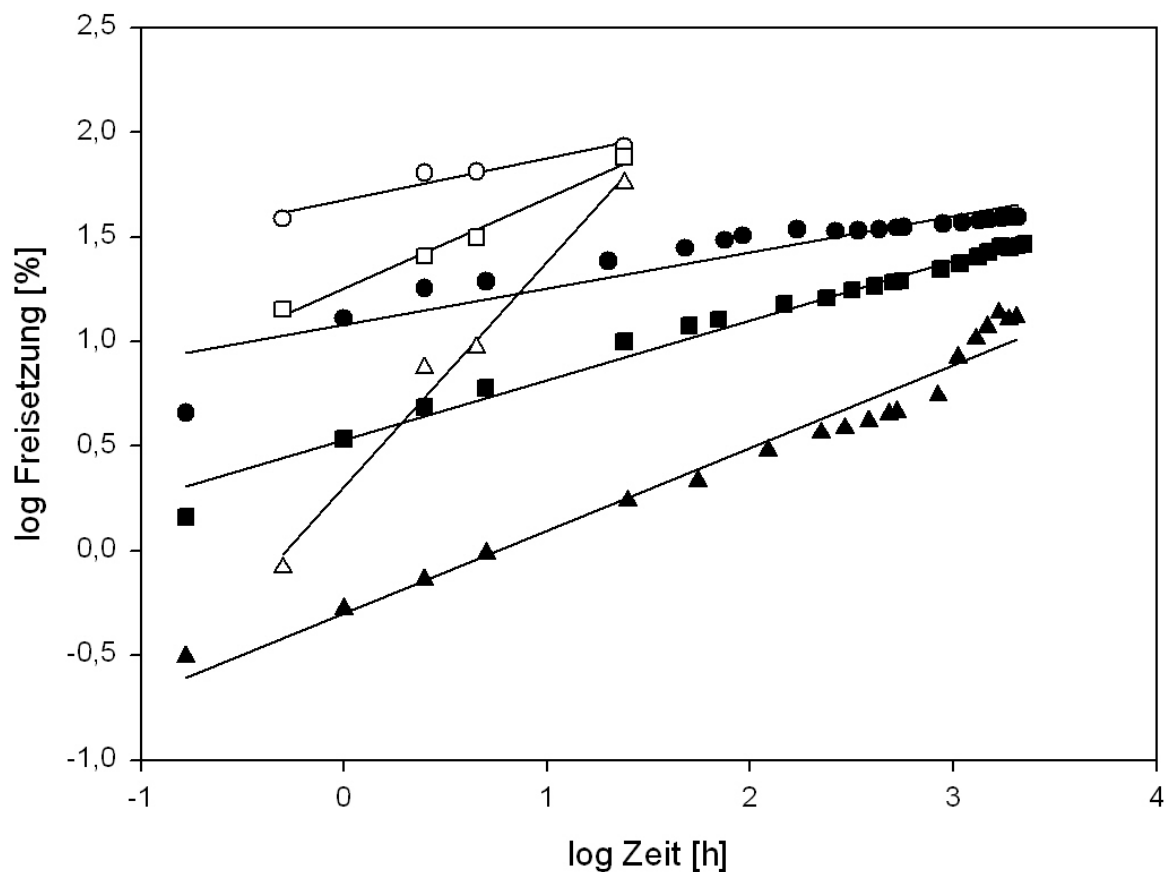


**Abbildung 4.23: vermuteter Ablauf bei der alkalischen Hydrolyse der HES-HEMA-Netzwerkstruktur**

Bei einer geringeren Netzwerkdichte hat die Hydrolyse einzelner Verknüpfungsstellen einen größeren Einfluss als bei einer höheren Netzwerkdichte mit vielen Knotenpunkten, wodurch schneller größere Poren entstehen und die Diffusion der Dextrane immer weniger behindert ist.



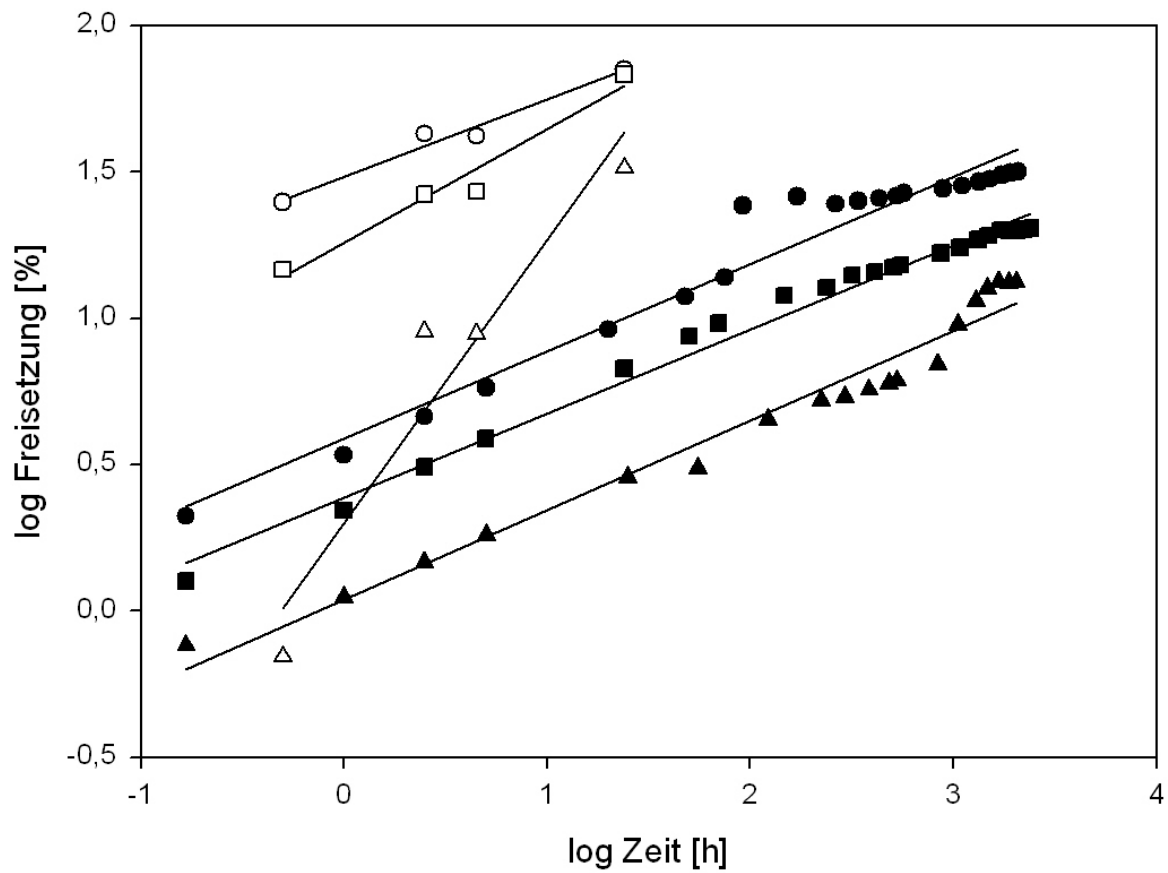
Genauer lässt sich die Freisetzung bei pH 7 und 9,6 in doppellogarithmischer Darstellung vergleichen und so eine Aussage über den maßgebenden Freisetzungsmechanismus getroffen werden (s. Absatz 2.3). Dazu werden die Werte des freigesetzten Wirkstoffanteils in Prozent sowie die Zeitangaben in Stunden logarithmiert gegeneinander aufgetragen (s. Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25). Der aus der Steigung ermittelbare Diffusionsexponent ist in den Tabellen 4.7 und 4.8 aufgeführt.



**Abbildung 4.24:** Freisetzung von FITC-Dextran 70 kDa aus Mikrosphären mit DS 0,055 in den Akzeptormedien Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) (weiße Symbole) und in Natriumphosphatpuffer (pH 7) (schwarze Symbole) in logarithmischer Darstellung:  
 ●○ FD 20; ■□ FD 70; ▲▲ FD 500

**Tabelle 4.7: Geradengleichungen und Bestimmtheitsgrade aus den Potenzgesetzberechnungen der Freisetzung nach Peppas für Mikrosphären mit einem DS von 0,055**

<b>System</b>	<b>Geradengleichung</b>	<b>Diffusionsexponent</b>	<b>Bestimmtheitsgrad</b>
DS 0,055	$\lg \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = \lg k + n \cdot \lg t$	<b>n</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
pH 7 FD 20	y = 0,1729x + 1,0808	0,173	0,849
pH 7 FD 70	y = 0,2863x + 0,5278	0,286	0,983
pH 7 FD 500	y = 0,3964x - 0,3005	0,396	0,966
pH 9,6 FD 20	y = 0,2009x + 1,6764	0,201	0,940
pH 9,6 FD 70	y = 0,4311x + 1,2557	0,431	0,986
pH 9,6 FD 500	y = 1,0752x + 0,3072	1,075	0,985



**Abbildung 4.25:** Freisetzung von FITC-Dextran 70 kDa aus Mikrosphären mit DS 0,22 in den Akzeptormedien Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) (weiße Symbole) und in Natriumphosphatpuffer (pH 7) (schwarze Symbole) in logarithmischer Darstellung:  
 ●○ FD 20; ■□ FD 70; ▲▲ FD 500

**Tabelle 4.8: Geradengleichungen und Bestimmtheitsgrade aus den Potenzgesetzberechnungen der Freisetzung nach Peppas für Mikrosphären mit einem DS von 0,22**

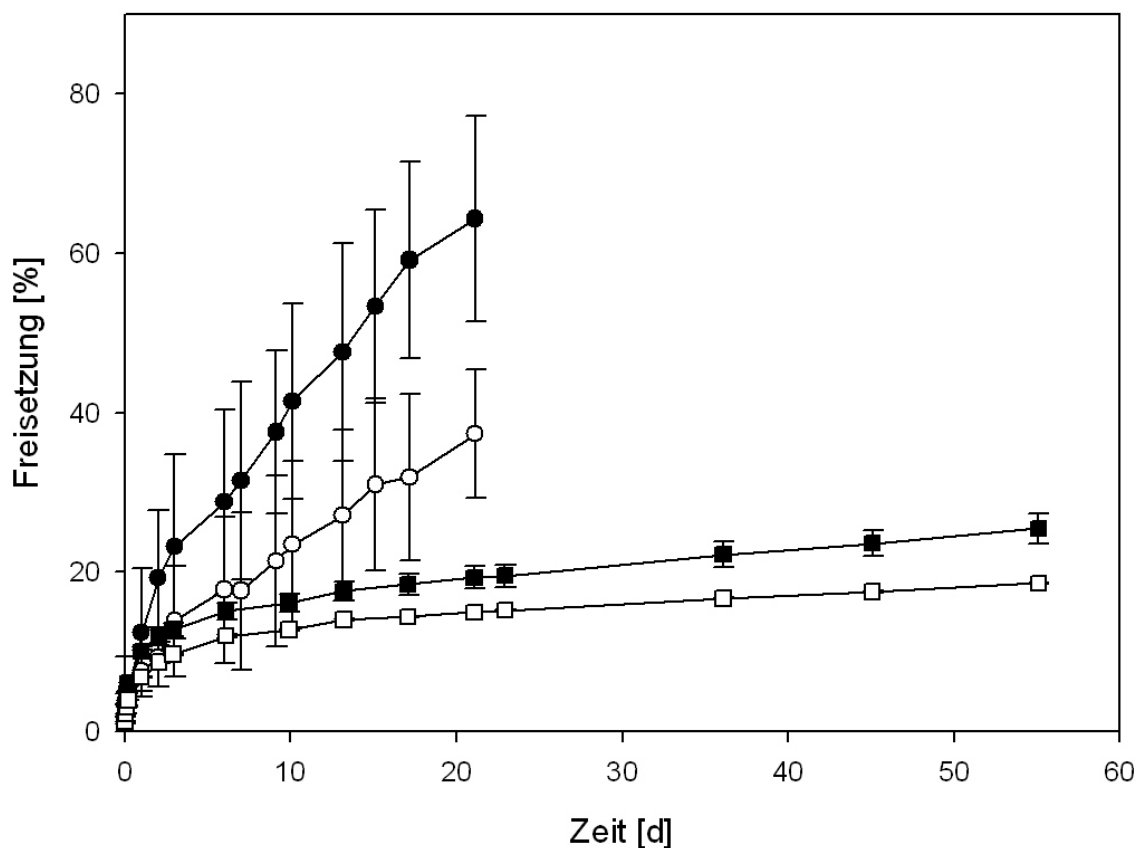
System	Geradengleichung	Diffusionsexponent	Bestimmtheitsgrad
	$\lg \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = \lg k + n \cdot \lg t$	n	R <sup>2</sup>
DS 0,22			
pH 7	y = 0,2985x + 0,5865	0,299	0,956
FD 20			
pH 7	y = 0,287x + 0,3878	0,287	0,987
FD 70			
pH 7	y = 0,3061x + 0,0375	0,306	0,968
FD 500			
pH 9,6	y = 0,2635x + 1,4846	0,264	0,972
FD 20			
pH 9,6	y = 0,3889x + 1,2569	0,389	0,963
FD 70			
pH 9,6	y = 0,9674x + 0,299	0,967	0,921
FD 500			

Nach den Aussagen von Ritger et al. [63] für polydisperse, quellbare Sphären verlaufen Freisetzungsmechanismen mit einem Diffusionsexponenten von 0,30 nach dem Fick'schen Diffusionsmechanismus, bei einem Exponenten von über 0,45 handelt es sich um einen Degradationsvorgang. Ordnet man diesen Angaben die ermittelten Werte aus den Tabellen 4.7 und 4.8 zu, so kann man die Aussage treffen, dass die Freisetzung in Puffer mit einem pH – Wert von 7 nur durch Diffusion erfolgt. Die Mikrosphären, die in bei pH 9,6 inkubiert wurden, zeigen Werte der Diffusionsexponenten, die für einen Freisetzungsmechanismus durch Degradation sprechen. Ausnahmen bilden die Mikrosphären die FITC-Dextran mit einer Molekülgröße von 20 kDa, dessen Freisetzung aufgrund der kleinen Molekülgröße auch unter degradativen Bedingungen dem Diffusionsmechanismus folgt.

Da die Bestimmtheitsgrade der Geradengleichungen (R<sup>2</sup>) zum Teil stark von 1 abweichen (s. Tabelle 4.7 und 4.8) und die Anwendbarkeit der Potenzgesetze

definitionsgemäß nur für moderat quellende Mikropartikel gilt [63], sind die Werte nur als Annäherung zu betrachten. Eine weitere Einschränkung für die Anwendbarkeit dieses Gesetzes ist, dass die Gültigkeit definitionsgemäß nur bis 60 % des freigesetzten Wirkstoffes besteht, wodurch die Messpunkte auf die ersten vier Werte bei der Freisetzung bei pH 9,6 reduziert werden mussten, somit also nur wenige Werte für die Darstellung zur Verfügung stehen.

Wählt man humanes Serum als Akzeptormedium, so erkennt man im Vergleich zum Natriumphosphatpuffer eine beschleunigte Freisetzung bei verschiedenen Netzwerkichten. Ein niedriger DS setzt auch in humanem Serum schneller frei als ein hoher DS.

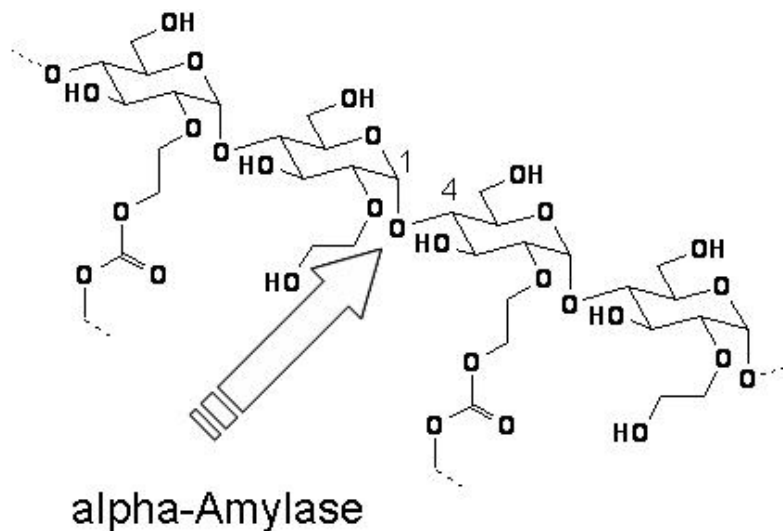


**Abbildung 4.26: Freisetzung von FITC-Dextran 70 kDa aus Mikrosphären mit DS 0,055 und 0,22 in den Akzeptormedien Natriumphosphatpuffer und humanes Serum:**

● Mikrosphären HES-HEMA (DS 0,055) in Serum; ○ Mikropartikel HES-HEMA (DS 0,22) in Serum  
■ Mikrosphären HES-HEMA (DS 0,055) in Natriumphosphatpuffer; □ Mikropartikel HES-HEMA (DS 0,22) in Natriumphosphatpuffer

In humanem Serum ist das Enzym alpha-Amylase enthalten. Bei gesunden Menschen liegt die Konzentration von alpha-Amylase bei 40-100 U/L [110].

Dieses Enzym ist eine Endo-Amylase und spaltet das HES-Rückgrat im Inneren der Polymerkette (s. Abbildung 4.27) [89, 111].



**Abbildung 4.27: Enzymatische Spaltung des HES - Rückrates durch alpha-Amylase**

Das natürliche Substrat einer Amylase ist Amylose, worauf sich auch die Aktivitätseinheit U/L bezieht [112]. U steht für Unit und entspricht einer Einheit für die Enzymmenge, welche die Umwandlung von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat in 1 min katalysiert [8].

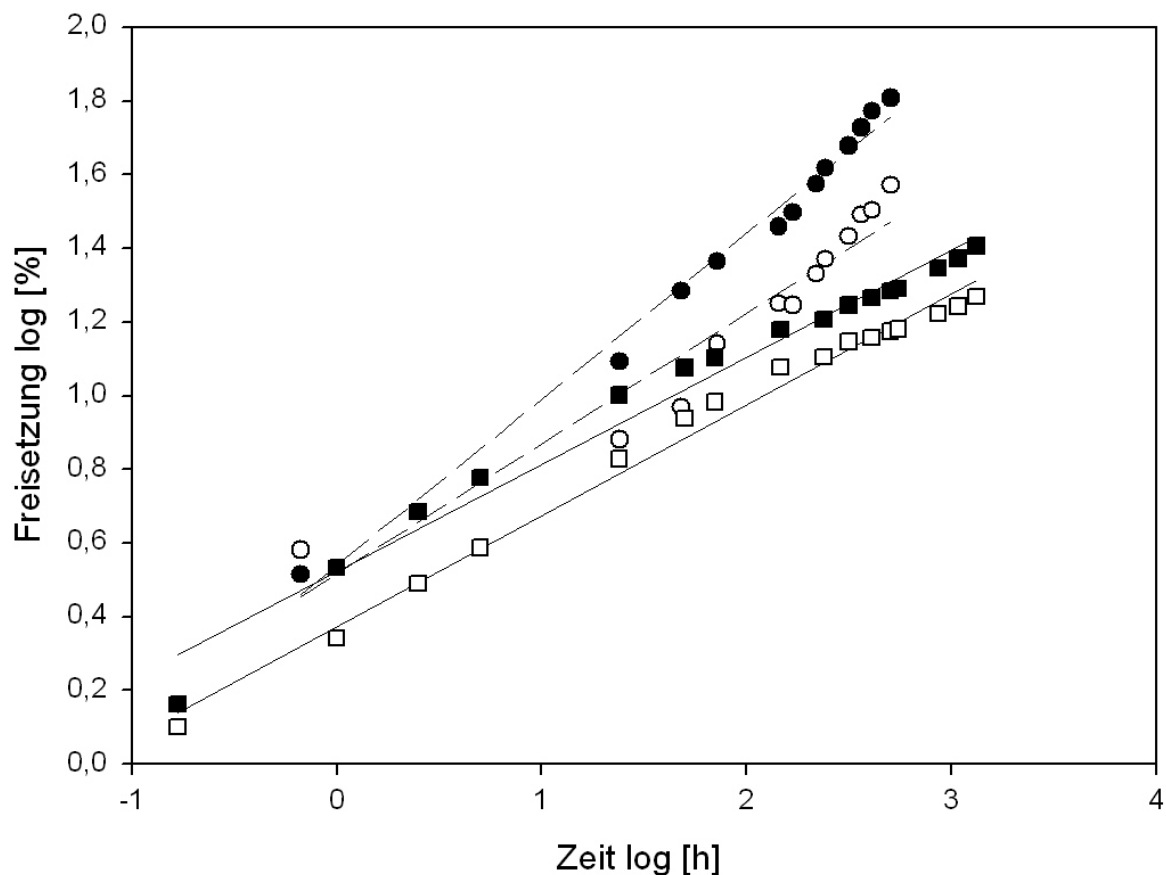
Bei einem anderen Substrat, wie dem HES-HEMA, wird ein sehr viel langsamerer Substratumsatz erwartet, da die Substrat-Enzymwechselwirkungen nicht optimal sind und das Substrat dem Enzym nicht gut zugänglich ist.

Durch den Abbau des HES-Rückgrates in Gegenwart von alpha-Amylase entstehen lockere Netzwerkverbindungen und größere Poren, wodurch die schnellere Freisetzung von Dextran ermöglicht wird. Hier spielt beim Vergleich der beiden Netzwerkdichten (DS 0,05 und 0,22) die sterische Zugänglichkeit der HES für die alpha-Amylase eine Rolle. Diese ist in einem gröberen Netzwerk einfacher als in einem engmaschigen, beziehungsweise die Anlagerung des Enzyms ist in der Nähe einer Seitenkette durch sterische Abschirmung erschwert.

Die Standardabweichungen der prozentualen Freisetzung im humanen Serum sind im Vergleich zu der im Puffer deutlich erhöht. Das humane Serum ist trüb und hat in der Fluoreszenzmessung eine gewisse Eigenfluoreszenz, also einen höheren Blindwert, der die Fehlerwahrscheinlichkeit erhöht.

Ein anderer Faktor, der den Umgang mit Serum erschwert, ist eine erhöhte Neigung zur Schaumbildung, wodurch der Pipettierfehler erhöht wird.

Die Freisetzungsversuche in Serum mussten bereits nach ca. 22 Tagen auf Grund von starkem Bakterienbefalls abgebrochen werden. Eine Konservierung des Serums mit Natriumazid und Tetrazyklin und das Arbeiten unter einer LaminarAirFlow® Bank konnte das mikrobielle Wachstum nicht verhindern, da die Verunreinigung vermutlich mit den Mikrosphären in das Freisetzungssystem gelangt war.



**Abbildung 4.28:** Freisetzung von FITC-Dextran 70 kDa aus Mikrosphären mit DS 0,055 und 0,22 in den Akzeptormedien Natriumphosphatpuffer und humanen Serum in logarithmischer Darstellung: ● Mikrosphären HES-HEMA (DS 0,055) in Serum; ○ Mikropartikel HES-HEMA (DS 0,22) in Serum; ■ Mikrosphären HES-HEMA (DS 0,055) in Natriumphosphatpuffer; □ Mikropartikel HES-HEMA (DS 0,22) in Natriumphosphatpuffer

Wertet man die Freisetzungsergebnisse in Serum und Puffer nach dem Potenzgesetz nach Peppas aus, kann eine Aussage über den maßgebenden Freisetzungsmechanismus erhalten werden (s. Absatz 2.3). Dazu werden die Werte des freigesetzten Wirkstoffanteil in Prozent (hier FITC-Dextran 70 kDa), sowie die Zeitangaben in Stunden logarithmiert gegeneinander aufgetragen (s. Abbildung 4.28). Der aus der Steigung ermittelbare Diffusionsexponent ist in Tabelle 4.9 aufgeführt.

**Tabelle 4.9: Geradengleichungen und Bestimmtheitsgrade aus den Potenzgesetzberechnungen der Freisetzung nach Peppas**

System	Geradengleichung	Diffusionsexponent	Bestimmtheitsgrad
	$\lg \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = \lg k + n \cdot \lg t$	n	R <sup>2</sup>
DS 0,055 in Serum	y = 0,4504x + 0,54	0,450	0,986
DS 0,22 in Serum	y = 0,3531x + 0,5175	0,353	0,919
DS 0,055 in Puffer	y = 0,2908x + 0,5235	0,291	0,978
DS 0,22 in Puffer	y = 0,3008x + 0,3748	0,301	0,990

Ordnet man wieder den Aussagen von Ritger et al. die ermittelten Werte aus Tabelle 4.9 zu (s. Absatz 2.3), so bestätigt sich die Aussage, dass die Freisetzung in Puffer mit einem pH – Wert von 7 nur durch Diffusion erfolgt, da die Werte des Diffusionsexponenten kleiner gleich 0,30 sind. Die Mikrosphären, die in humanem Serum inkubiert wurden, zeigen Werte der Diffusionsexponenten bis zu 0,45, die für einen degradativen Freisetzungsmechanismus sprechen.



### 4.3 Magnetrelaxometriemessungen zur Netzwerkcharakterisierung

Die Magnetrelaxometrieuntersuchungen zur Netzwerkcharakterisierung basieren auf der Theorie, dass immobilisierte und mobile Eisennanopartikel nach kurzzeitigem Anlegen eines magnetischen Feldes unterschiedlich relaxieren. Der Anteil an immobilisierten und mobilen MNPs verändert sich bei Variation der Netzwerkdichte, was bereits bei der Netzwerkausbildung von Hydrogelen gezeigt werden konnte [90, 103, 113].

#### 4.3.1 Visuell sichtbarer Abbau der MNP-beladenen Hydrogelzylinder

Das Hydrogelnetzwerk wird in Gegenwart von alpha Amylase abgebaut, was auch visuell erkennbar ist. Die Hydrogelzylinder wurden zu ausgewählten Zeitpunkten fotografiert (s. Abbildung 4.29). Den unterschiedlichen Substitutionsgrad der Hydrogele erkennt man bereits zu Beginn der Untersuchungen durch die stärkere Trübung des Gels bei höherer Netzwerkdichte. Nach Inkubation von 46 h ist dieser Unterschied visuell noch deutlicher zu erkennen. Nach 17,5 Tagen lässt sich beim Vial-Inversion-Test (Umdrehen des Probengefäßes) sehen, dass die Hydrogelzylinder des niedrigeren DS bereits soweit abgebaut sind, dass sie sich frei in der Akzeptorlösung bewegen können. Für das Gel mit dem DS 0,208 ist eine freie Beweglichkeit erst nach ca. 31 Tagen gegeben.

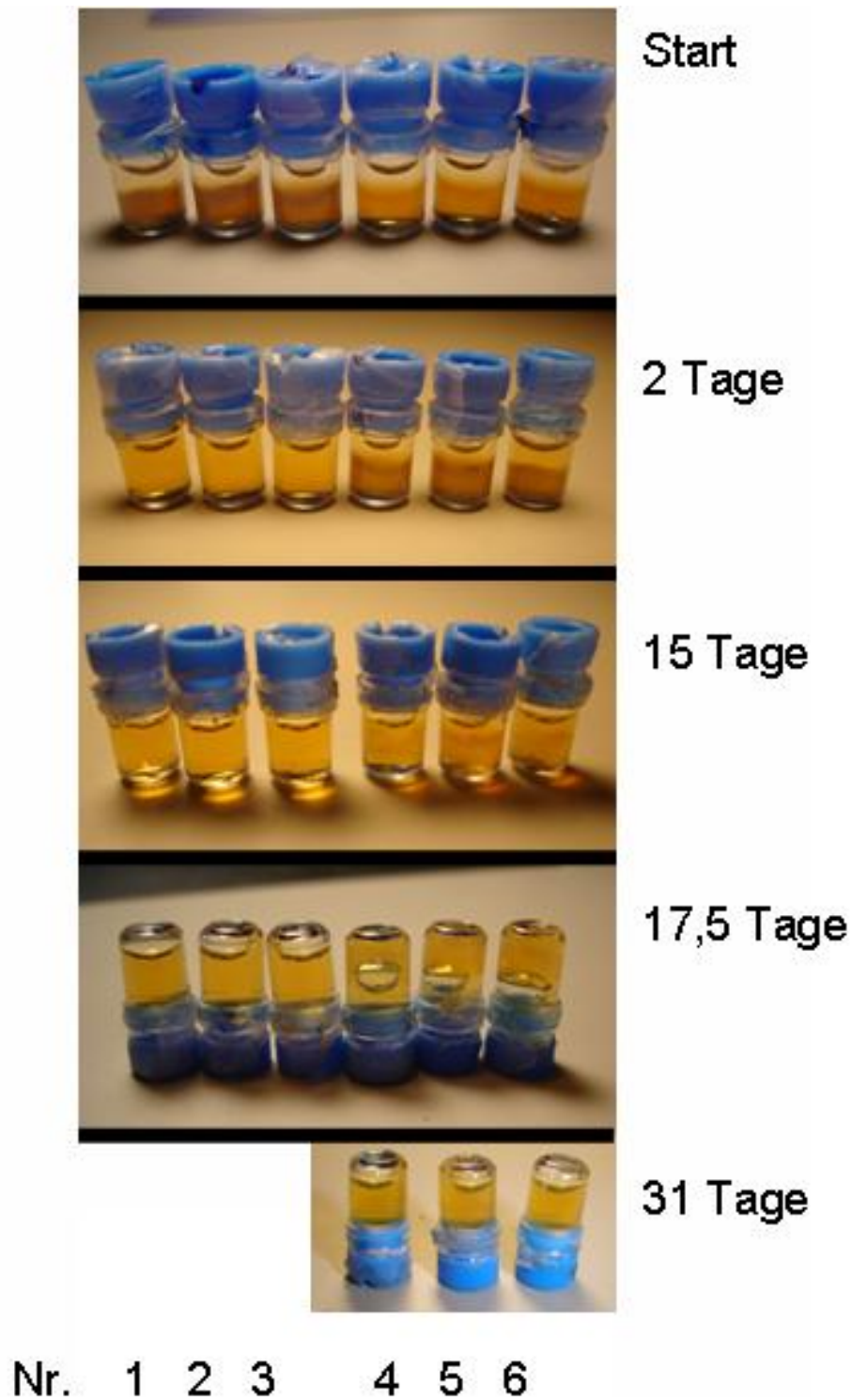


Abbildung 4.29: Gelzylinder beladen mit MNPs zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubation mit alpha-Amylase; Zylinder Nr. 1-3: DS 0,074 ; Zylinder Nr. 4-6: DS 0,208

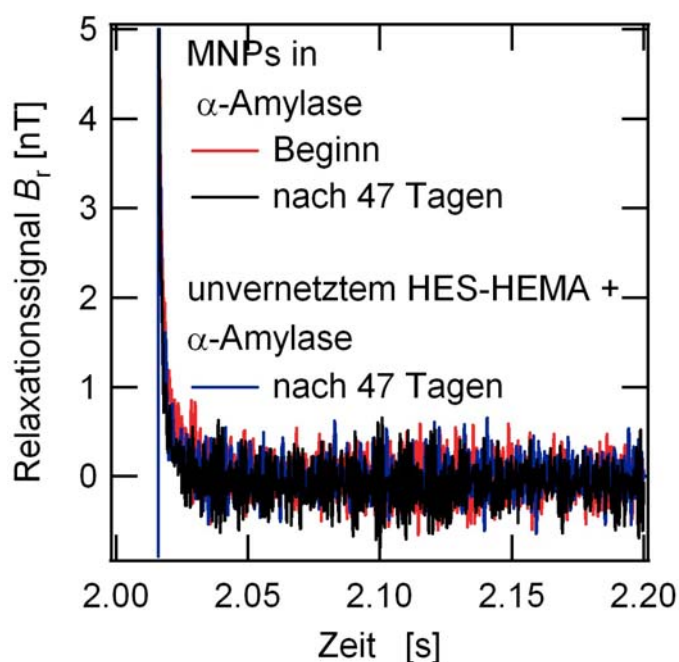
Visuell lässt sich ein Trend, dass Hydrogele mit einem niedrigeren DS schneller durch  $\alpha$ -Amylase-Lösung abgebaut werden, beobachten. Eine detailliertere Beobachtung ist visuell allerdings nicht zu erreichen, hier kann man über das MRX-Verfahren deutlichere Aussagen erlangen.

#### 4.3.2 Stabilität der Eisennanopartikel

Um die MRX-Untersuchungen zur Charakterisierung einzusetzen, ist zunächst die Stabilität der MNPs unter den Versuchsbedingungen abzuklären.

Die Relaxationskurven der MNPs in  $\alpha$ -Amylase-Lösung liegen sowohl zu Beginn der Inkubation als auch nach 47 Tagen übereinander. Den gleichen Kurvenverlauf erhält man beim Vermessen von MNPs in unvernetzter HES-HEMA-Lösung nach 15-tägiger Inkubation (s.

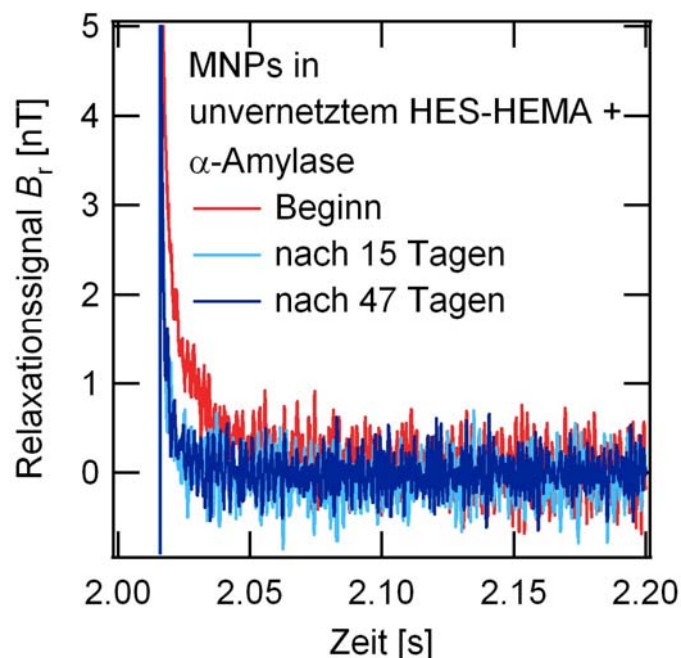
Abbildung 4.30).



**Abbildung 4.30:** Relaxationskurven von MNPs in  $\alpha$ -Amylase-Lösung zu Beginn und nach 15 Tagen der Inkubation bei 37 °C im Vergleich mit dem Relaxationsverlauf von MNPs in unvernetzter HES-HEMA-Lösung mit  $\alpha$ -Amylase nach 15-tägiger Inkubation

Die magnetischen Nanopartikel zeigen also keine Veränderung des Relaxationsverhaltens nach 47-tägiger Inkubation in alpha-Amylase-Lösung bei 37 °C. Daraus kann man schließen, dass die Gummi-Arabicum-Hülle der MNPs während der Inkubation nicht angegriffen wird und dass die MNPs für die Abbauuntersuchungen geeignet sind.

Die Referenzlösungen, die aus einer Suspension von MNPs in unvernetzter HES-HEMA Lösung mit 100 µl alpha-Amylase Lösung bestehen, zeigen nach Inkubation bei 37 °C über die Versuchsdauer Relaxationskurven mit einer kürzeren Brown-Zeitkonstante (s. Abbildung 4.31).



**Abbildung 4.31: Relaxationskurven von MNPs in unvernetzter HES-HEMA Lösung mit alpha-Amylase zu Beginn und nach 15-tägiger Inkubation bei 37 °C**

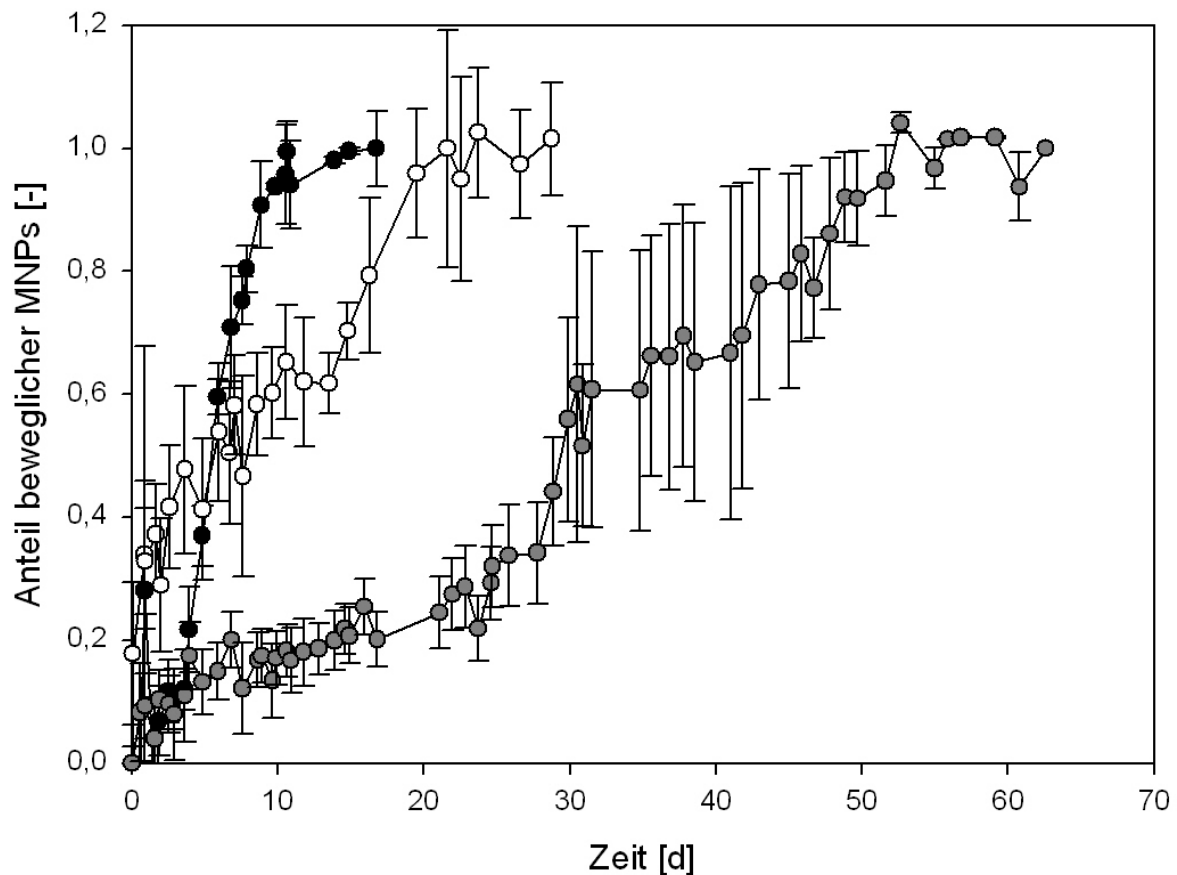
Diese Zunahme der Beweglichkeit der MNPs lässt sich durch die Abnahme der Viskosität der umgebenden Flüssigkeit erklären. 150 µl einer 10%igen HES-HEMA Lösung besitzt bei 37 °C eine Viskosität von ca. 29 mPa, vermischt mit 100 µl alpha-Amylase-Lösung 3,2 mPa. Nach 2 Stunden ist die Viskosität bereits auf 2,1 mPa und nach 15 Stunden auf 1,5 mPa abgesunken. Alpha-Amylase baut die HES-HEMA

Ketten über die Zeit ab. Zuerst entstehen dabei kleinere Polymerketten, nach komplettem Abbau Glucose beziehungsweise Glucose-HEMA Moleküle wodurch die Viskosität abnimmt.

Beim Vergleich (Abbildung 4.31) erkennt man anhand der Relaxationskurven, dass die Viskosität der HES-HEMA-Lösung nach 15-tägiger Inkubation mit alpha-Amylase eine vergleichbare Viskosität wie MNPs in reiner alpha-Amylase-Lösung aufweist (Viskosität: 0,96 mPa bei 37 °C).

Für die Beobachtungen des Hydrogelabbaus wurden MNPs eingebettet in Hydrogele mit verschiedenen DS eingesetzt und die Mobilität der MNPs wurde über die Zeit untersucht (s. Absatz 3.2.16).

In Abbildung 4.32 sind die magnetischen Differenzwerte des Relaxationsfeldes von drei verschiedenen Hydrogelzylindern mit unterschiedlichen Netzwerkichten dargestellt. MNPs in einem hoch vernetzten Hydrogel zeigen erst nach ca. 25 Tagen Inkubation eine deutliche Zunahme der Beweglichkeit, die nach ca. 50 Tagen vollständig wiederhergestellt ist. Die Nanopartikel in einem Hydrogel mit DS 0,110 zeigen bereits nach ca. 25 Tagen vollständige Brown-Relaxation, MNPs in einem Hydrogel DS 0,074 bereits nach 16 Tagen (s. Abbildung 4.32).

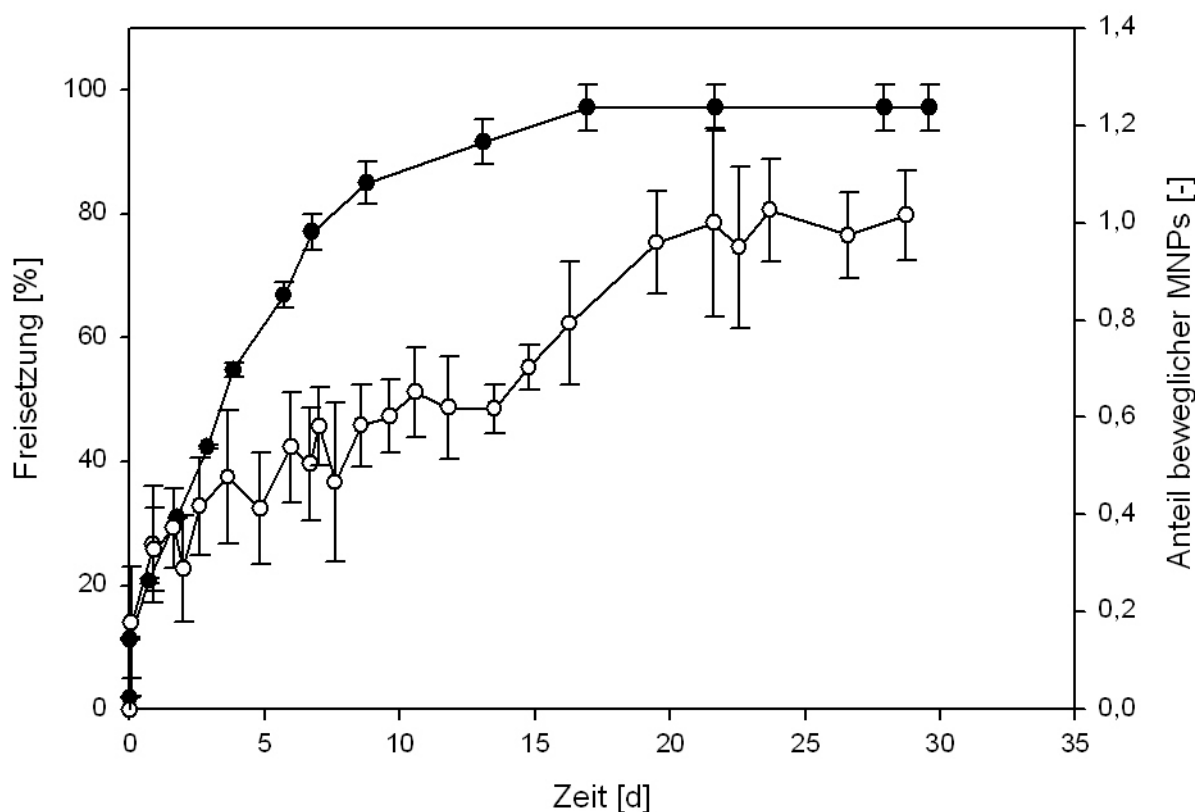


**Abbildung 4.32: Messwerte aus Relaxationskurven über die Zeit als qualitative Aussage über die Beweglichkeit der Nanopartikel eingebettet in Hydrogelen mit unterschiedlicher Netzwerkdicke inkubiert in alpha-Amylase-Lösung bei 37°C:**  
 ● DS 0,074, ○ DS 0,110, ● DS 0,208

MNPs die in einem Hydrogel eingebettet sind, sind in ihrer Beweglichkeit gehemmt. Nach Ausrichtung im magnetischen Feld werden sie daher überwiegend über den Néel-Mechanismus relaxieren. Durch den Abbau des Hydrogelnetzwerkes entstehen größere Poren, wodurch die MNPs eine ausreichende Beweglichkeit erhalten, um vermehrt nach dem Brown-Mechanismus zu relaxieren. Der Abbau erfolgt durch alpha-Amylase und durch alkalische Hydrolyse, der in einem starkvernetzten Hydrogel einen längeren Zeitraum in Anspruch nimmt (s. Absatz 4.2.4).

Da die Messungen nicht in einem abgeschirmten Raum durchgeführt wurden, waren die Messungen gewissen Störungen aus der Umgebung ausgesetzt. So können Störungen im Messsignal entstehen, wenn in der Umgebung der Apparatur Metallgegenstände bewegt wurden. Dadurch lässt sich das stark verrauschte Signal in den Relaxationskurven sowie die hohen Standardabweichungen in den Degradationskurven erklären.

In Abbildung 4.33 sind die Freisetzung von FITC-Lysozym aus Hydrogelzylindern sowie die Differenzwerte der Relaxationskurven unter den in Absatz 3.2.16 beschriebenen Bedingungen gegenübergestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die Freisetzung nach 17 Tagen abgeschlossen ist, während die vollständige Beweglichkeit der MNPs erst nach 21 Tagen wieder hergestellt ist.



**Abbildung 4.33:** Freisetzung von FITC-Lysozym aus einem Hydrogelzylinder mit einem DS von 0,110 (● Symbol) im Vergleich zur Zunahme der Beweglichkeit von magnetischen Nanopartikeln (○ Symbol) über die Zeit

Diese Diskrepanz lässt sich mit der vorherrschenden Viskosität erklären, die sich in den MRX-Messungen auswirkt, nicht aber in den Freisetzungsuntersuchungen. Da die Substanzen eine unterschiedliche Größe besitzen, erfahren sie eine unterschiedliche Mikroviskosität. Des Weiteren spielt sicherlich auch die höhere mechanische Belastung eine Rolle, denen die Freisetzungsmodelle mit FITC-Lysozym ausgesetzt waren. Für den Probenzug wurden die Gefäße geöffnet und Akzeptorlösung ausgetauscht werden. Diese zusätzliche Beanspruchung trägt sicherlich ebenfalls zu einer beschleunigten Freisetzung des FITC-Lysozyms im Vergleich zur Zunahme der Beweglichkeit der MNPs im Hydrogel bei.

Dennoch erweisen sich MRX-Messungen für die Beobachtung der Hydrogeldegradation grundsätzlich als geeignet. Dabei könnte die Qualität der Messungen sicherlich noch durch einen optimierten Versuchsaufbau verbessert werden, zum Beispiel durch bessere Abschirmung des Messraums gegen Störungen aus der Umgebung.



## 4.4 Co Immobilisierte alpha-Amylase

Für die Co-Immobilisierung von alpha-Amylase in HES-HEMA-Mikropartikeln mit einem DS von 0,074 und 0,106 wurden drei verschiedene Konzentrationen des Enzyms eingeschlossen.

Die alpha-Amylase besitzt eine molekulare Masse von 69 kDa und es wurden 10 U, 1 U beziehungsweise 0,1 U je Herstellungsansatz für Mikrosphären eingesetzt.

Diese Konzentrationen wurden in Anlehnung an die in humanem Serum vorliegenden Konzentrationen sowie dem Einschluss von Dextranase in DEX-HEMA-Hydrogelzylinder der Arbeitsgruppe Hennink gewählt [114]. Dort wurde pro Hydrogelzylinder 1 U/Gel, 0,03U/Gel beziehungsweise 0,01 U/Gel eingeschlossen.

Die Einschlusseffizienz der alpha-Amylase in Mikrosphären wurde nicht untersucht, so dass die eingesetzte Menge lediglich als Orientierungswert für die vorherrschende Ezymmenge zu sehen ist.

Es wurde alpha-Amylase eingesetzt, die aus menschlichem Speichel gewonnen wurde. Dieses Enzym aus dem menschlichen Speichel bietet die Möglichkeit ein humanes Enzym zu verwenden ohne auf die sehr teure alpha-Amylase aus menschlicher Pankreas zurückgreifen zu müssen.

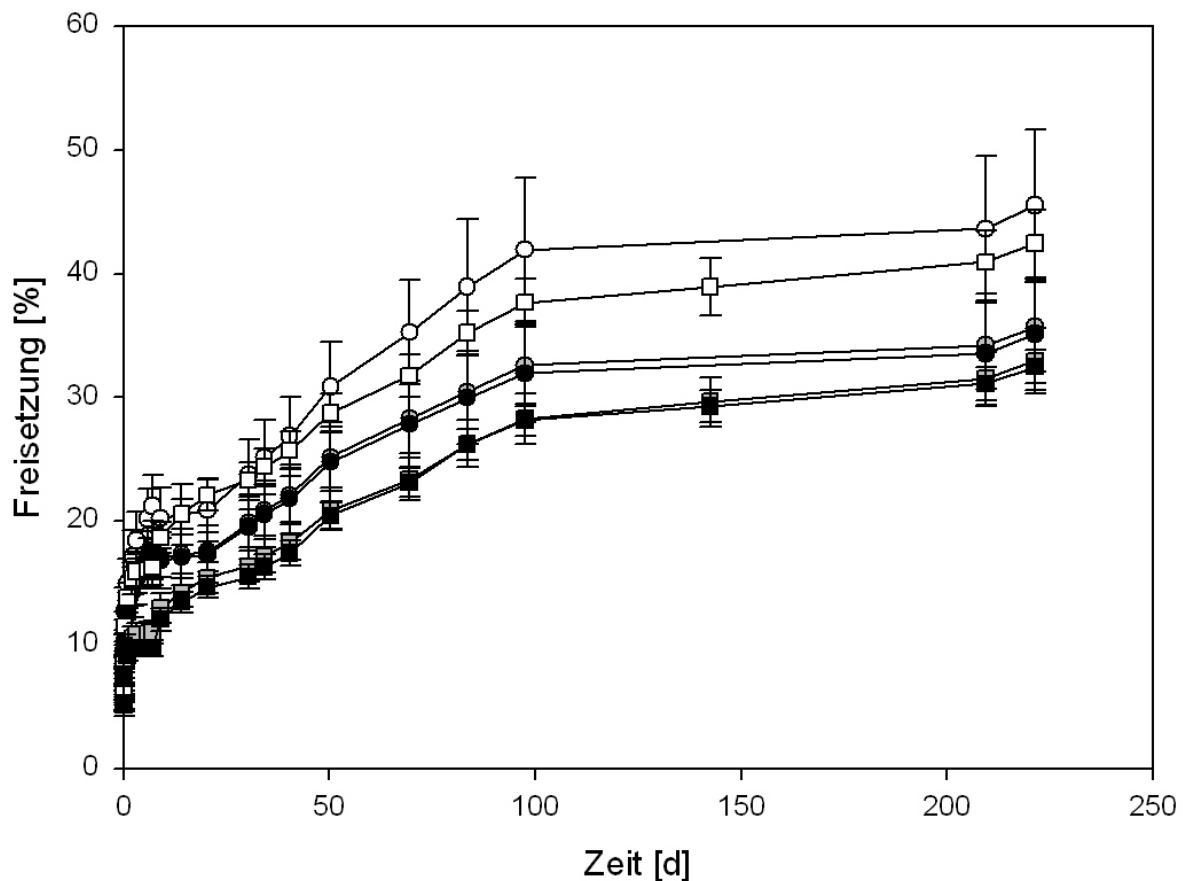
### 4.4.1 Freisetzung

FITC-Lysozym wurde mit zunehmender Menge eingeschlossener alpha-Amylase schneller freigesetzt. Zusätzlich kann man eine verlangsamte Freisetzung bei einem höheren DS beobachten (s. Abbildung 4.34, Absatz 4.2.1).

Beim Einschluss von 10 U alpha-Amylase lässt sich ein Unterschied zwischen den beiden Netzwerkichten beobachten, die geringere Netzwerkichte zeigt eine schnellere Freisetzung im Vergleich zur höheren Netzwerkichte. Vergleicht man die Freisetzung von FITC-Lysozym innerhalb einer Netzwerkichte, so verlaufen die Chargen mit 1 U beziehungsweise 0,1 U alpha-Amylase gleich, während der Freisetzungsverlauf von den 10 U alpha-Amylase enthaltenden Partikeln heraus sticht.

Daraus kann man schließen, dass eine Konzentration unter 1 U alpha-Amylase pro Mikrosphärencharge nicht ausreicht, um die Degradation des Hydrogels stark zu beeinflussen.

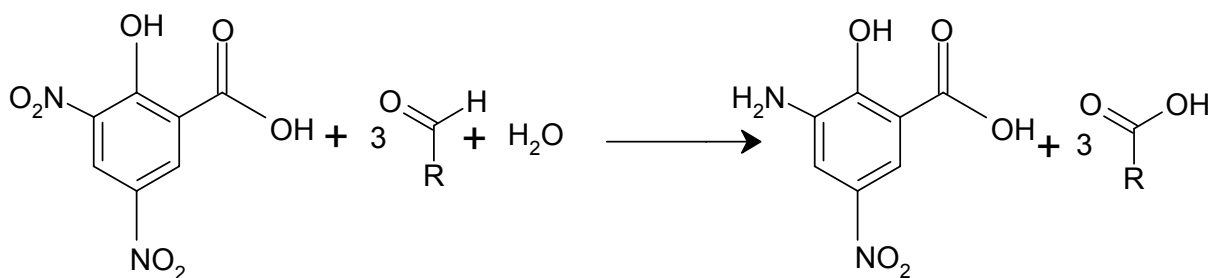
Den Einfluss der Netzwerkdicke auf die Degradation des HES-HEMA Netzwerks durch alpha-Amylase lässt sich zum einen durch die etwas verbesserte Mobilität des Enzyms innerhalb des Gels erklären sowie zum anderen durch die bessere Zugänglichkeit des HES-Rückgrates. Die Angriffsstellen des Enzyms sind die Verknüpfungsstellen 1 und 4 zwischen zwei Glucosemolekülen der HES-Kette (s. Absatz 4.2.4 und Abbildung 4.27).



**Abbildung 4.34: Freisetzung von FITC-Lysozym aus Mikrosphären mit verschiedenen Netzwerkichten und unterschiedlichen Konzentrationen an alpha-Amylase: ○ DS 0,074, alpha-Amylase 10 U; ● DS 0,074, alpha-Amylase 1 U; ● DS 0,074, alpha-Amylase 0,1 U; □ DS 0,106, alpha-Amylase 10 U; ■ DS 0,106, alpha-Amylase 1 U; ■ DS 0,106, alpha-Amylase 0,1 U**

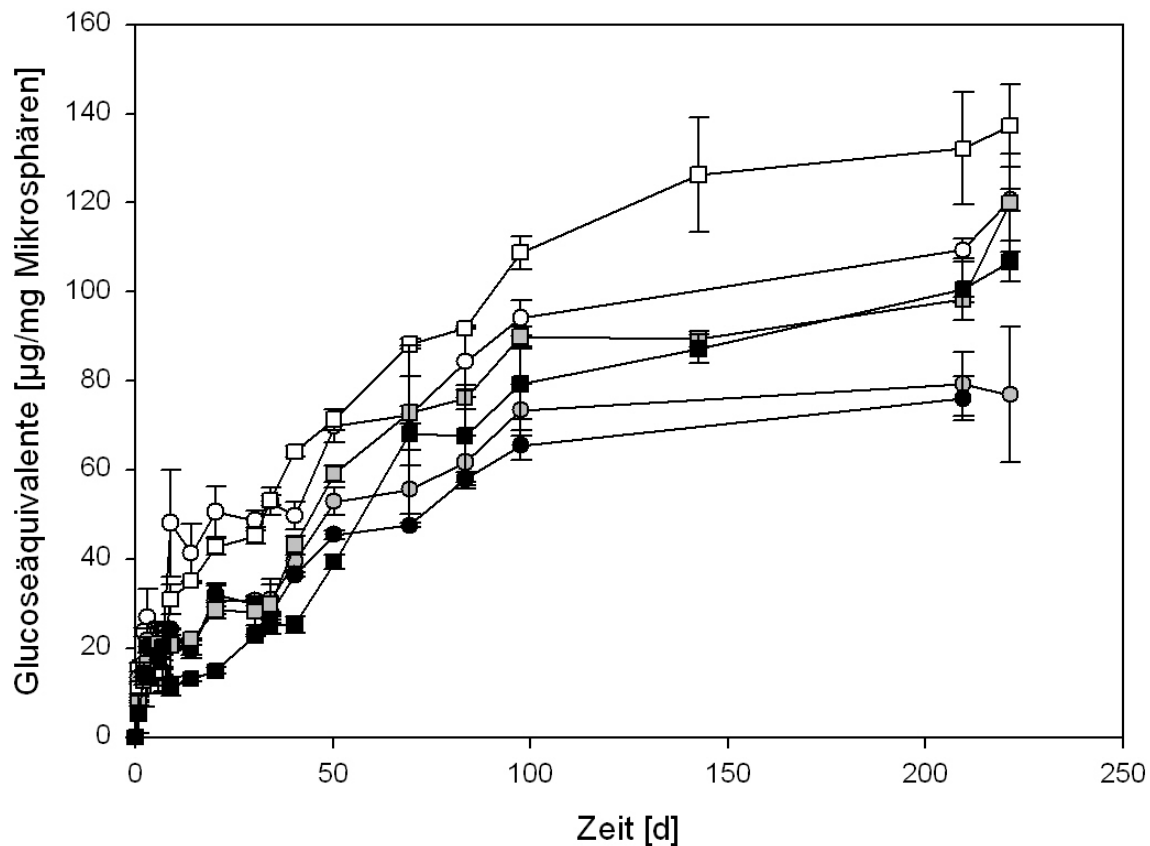
#### 4.4.2 Messung der Glucoseäquivalente

Alpha-Amylase baut das HES-HEMA-Molekül zwischen dem C1 und C4-Molekül ab wodurch reduzierende Enden entstehen. Diese lassen sich mit dem DNS-Messverfahren quantifizieren. Die Aldehydgruppe von reduzierenden Zuckern reduziert 3,5-Dinitrosalicylsäure zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure, wodurch die Farbe der Lösung von orangegelb nach rot umschlägt (s. Abbildung 4.35). Da als Referenz eine Glucose-Standardreihe gemessen wird, werden die Ergebnisse dieser Untersuchung in Glucoseäquivalenten angegeben.



**Abbildung 4.35: Redoxreaktion von 3,5-Dinitrosalicylsäure mit Aldehydgruppen zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure und Carbonsäure**

In Abbildung 4.36 ist der zeitliche Verlauf der Entstehung von Glucoseäquivalenten zu sehen. In Chargen, in denen 10 U alpha-Amylase eingesetzt wurde, entsteht die höchste Konzentration an reduzierenden Zuckern (s. Abbildung 4.36). Alle Hydrogele einer Netzwerkdichte mit 1 bzw. 0,1 U alpha-Amylase zeigen sehr ähnliche Verläufe (Vergleich Abbildung 4.34 und Abbildung 4.36).



**Abbildung 4.36:** Zunahme der Glucoseäquivalente über die Zeit bei Inkubation von Mikrosphären mit verschiedenen Konzentrationen an co-immobilisierter alpha-Amylase: ○ DS 0,074, alpha-Amylase 10 U; ● DS 0,074, alpha-Amylase 1 U; ● DS 0,074, alpha-Amylase 0,1 U; □ DS 0,106, alpha-Amylase 10 U; ■ DS 0,106, alpha-Amylase 1 U; ■ DS 0,106, alpha-Amylase 0,1 U

Vergleicht man die Chargen mit 10 U alpha-Amylase pro Herstellungsansatz in den ersten 30 Tagen der Inkubation ist die Konzentration an Glucoseäquivalenten der Charge mit der geringeren Netzwerkdicke höher als bei der größeren Netzwerkdicke. Ab 30 Tagen steigt die Konzentration der Glucoseäquivalente des höheren DS im Gegensatz zu der Charge mit einem DS 0,074 stärker an.

Eine Erklärung dieser Konzentrationsverläufe könnte in der Freisetzung der alpha-Amylase liegen. Zu Beginn kann in beiden Hydrogelpartikelchargen von einem ähnlichen Gehalt an Enzym ausgegangen werden. Das Hydrogel mit der Netzwerkdicke DS 0,074 zeichnet sich dadurch aus, dass die Poren im Netzwerk

bereits zu Beginn größer sind als im Hydrogel mit einem DS 0,104, wodurch auch die Freisetzung von alpha-Amylase bei einer niedrigen Netzwerkdicke begünstigt ist. Durch eine bessere Zugänglichkeit der HES-HEMA für die alpha-Amylase in einem wenig vernetzten Gel kann der Abbau des Gels bis zu einem gewissen Punkt schneller ablaufen als in einem hochvernetzten Gel. Das Gel aus HES-HEMA mit dem DS 0,074 wird also in den ersten 30 Tagen schneller abgebaut und eine höhere Konzentration an reduzierenden Enden entsteht. Das Netzwerk mit dem DS 0,074 ist ab diesem Punkt soweit porös, dass sowohl FITC –Lysozym wie auch alpha-Amylase schnell freigesetzt werden (s. Abbildung 4.34). Im Gegensatz dazu bleibt alpha-Amylase im Netzwerk mit dem DS 0,104 auch nach 30 Tagen in größerer Menge eingeschlossen und kann durch Abbau des HES-Gerüsts weiter reduzierende Zucker erzeugen.

Freigesetzte alpha Amylase wird durch jeden Probenzug bei den Freisetzungsuntersuchungen entzogen, da Akzeptorflüssigkeit entnommen und durch frischen Puffer ersetzt wird. Dadurch wird der freigesetzte Anteil der alpha-Amylase dem System entzogen und wird bei jedem Schritt in der Konzentration verringert. Je länger das Enzym im Inneren des Hydrogels verbleibt und die HES-Kette abbaut, umso mehr reduzierende Glucoseäquivalente können entstehen. Diesem Effekt liegt wahrscheinlich der Konzentrationsverlauf der Glucoseäquivalente des Hydrogels mit einem DS 0,104 ab 30 Tagen Inkubationszeit zugrunde.

Nach über 220 Tagen Inkubation waren die Hydrogelpartikel noch nicht vollständig abgebaut. Interessant wäre es daher, den Versuch mit höheren alpha-Amylase Konzentrationen zu wiederholen.

## 4.5 Antikörpereinschluss in Hydrogele

Der schonende Einschluss von Proteinen in ein Freisetzungssystem, sowie die Freigabe von unveränderten aktiven Proteinen sind Ziele bei der Entwicklung dieses Drug Delivery Systems. Für diese Untersuchungen wurde die Bindungsaktivität von Antikörpern in einer ELISA-Messung nachgewiesen. Ist der Antikörper strukturell verändert, ist die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung gestört.

Um einen Vergleich zwischen der biologischen Aktivität des Antikörpers und der tatsächlichen Konzentration nach der Freisetzung aus dem Hydrogel zu bekommen, wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt.

### 4.5.1 Stabilitätsuntersuchungen

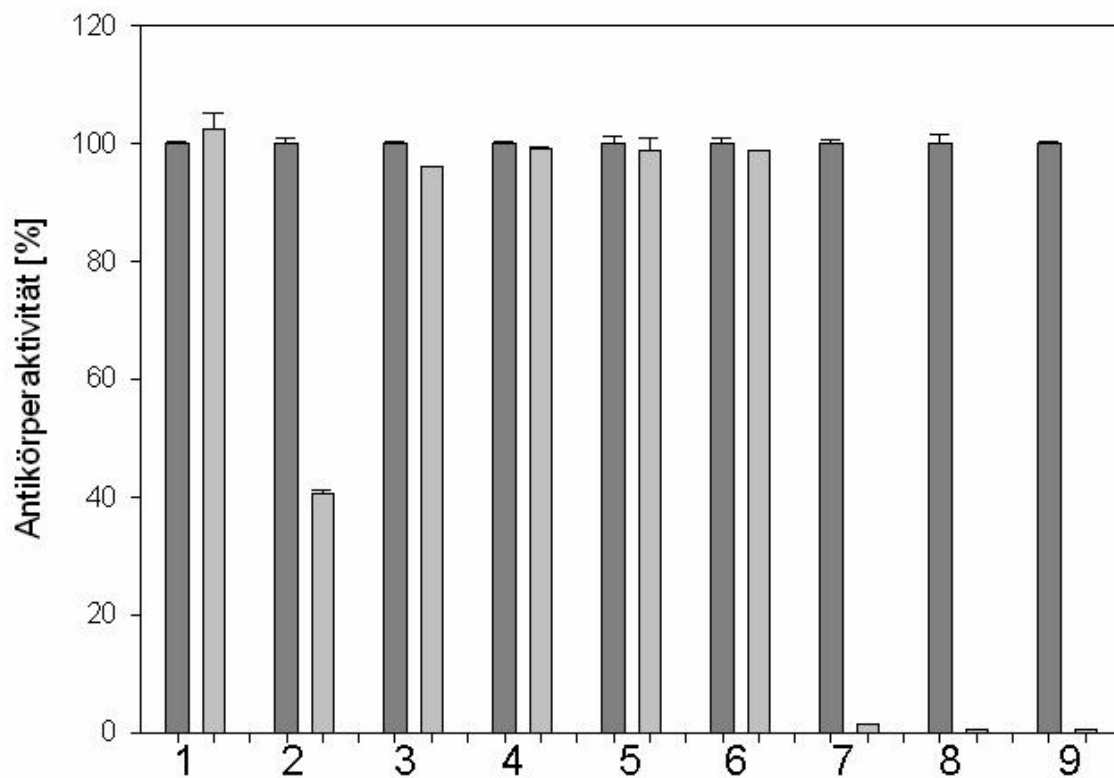
In den Stabilitätsuntersuchungen sieht man unterschiedliche Einflüsse verschiedener Substanzen und des UV-Lichts auf die Antikörper- und die Fluoreszenzaktivität.

In Abbildung 4.37 und Abbildung 4.38 (dunkelgraue Balken 1-9) sieht man, dass vor UV-Lichtbestrahlung in keiner der Untersuchungsansätze eine Abnahme der Antikörper- und Fluoreszenzaktivität festzustellen ist.

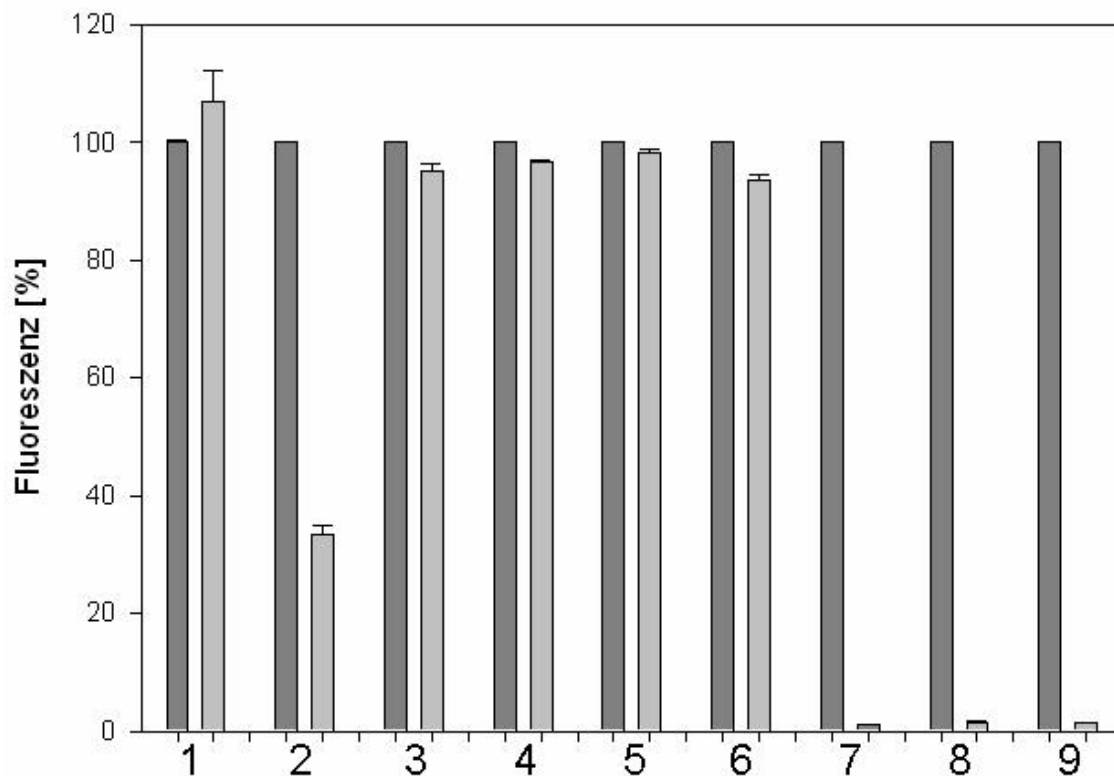
Auch nach UV-Bestrahlung sieht man ausschließlich eine Abnahme der Aktivitäten in Gegenwart des Photoinitiators Irgacure 2959<sup>®</sup>.

Bei einer Lösung aus Antikörper und Photoinitiator in Puffer ist die Abnahme der Fluoreszenz und der Bindungsaktivität im ELISA auf unter 1 % gesunken (Abbildung 4.37; Abbildung 4.38, Balken hellgrau Nr. 7-9).

In einem wässrigen Zweiphasensystem mit 60 ppm Photoinitiatorkonzentration fällt die Antikörperaktivität auf ca. 40% ab (Abbildung 4.37 und Abbildung 4.38, Balken hellgrau Nr. 2).



**Abbildung 4.37: Einfluss der Substanzen und Substanzgemische vor und nach UV-Bestrahlung auf die Antikörperaktivität: dunkle Balken - vor Bestrahlung, helle Balken - nach Bestrahlung: 1 wässriges Zweiphasensystem ohne Photoinitiator; 2 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator (entspr. 60 ppm); 3 PEG; 4 HES-HEMA; 5 HES; 6 Puffer; 7 Photoinitiator 30 ppm; 8 Photoinitiator 45 ppm; 9 Photoinitiator 60 ppm**

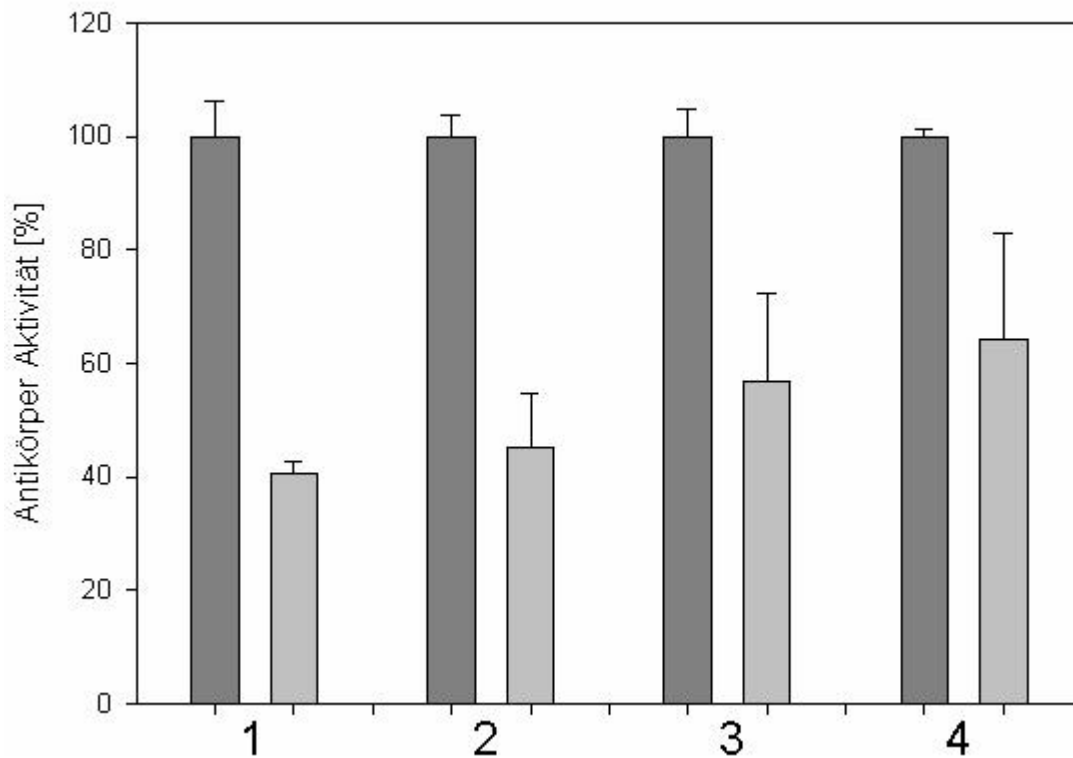


**Abbildung 4.38: Einfluss der Substanzen und Substanzgemische vor und nach UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenzaktivität: dunkle Balken - vor Bestrahlung, helle Balken - nach Bestrahlung: 1 wässriges Zweiphasensystem ohne Photoinitiator; 2 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator (entspricht 60 ppm); 3 PEG; 4 HES-HEMA; 5 HES; 6 Puffer; 7 Photoinitiator 30 ppm; 8 Photoinitiator 45 ppm; 9 Photoinitiator 60 ppm**

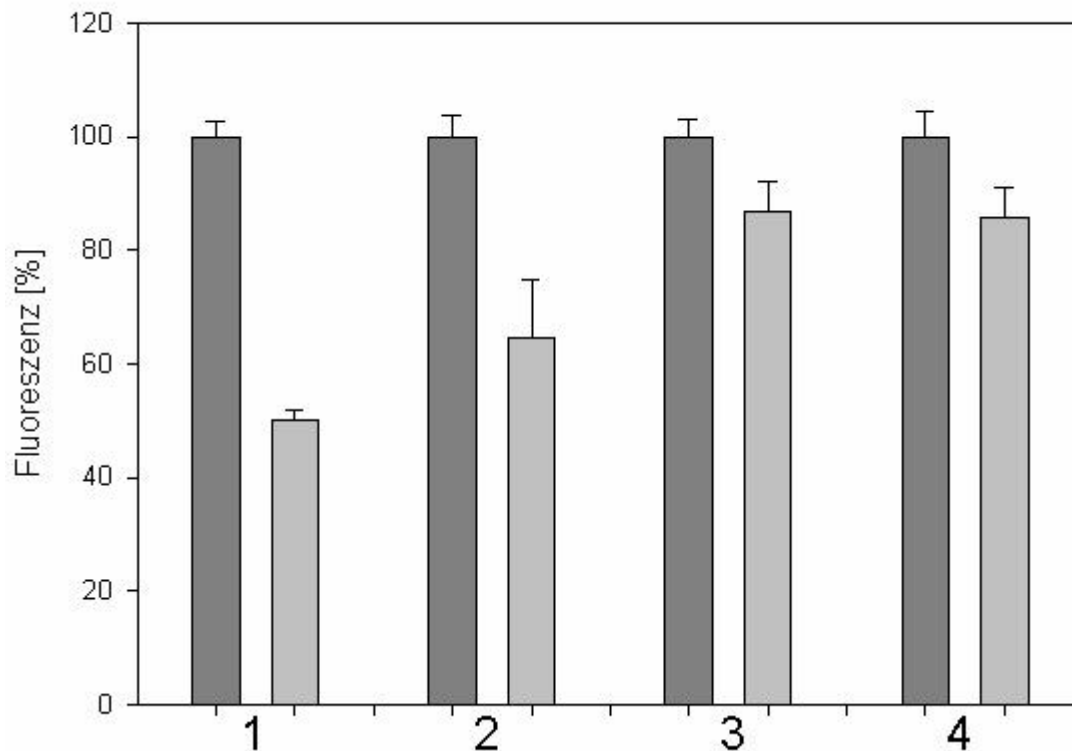
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden wässrige Zweiphasensysteme mit geringeren Photoinitiatorkonzentrationen hergestellt, zum einen mit HES für die Aktivitätsuntersuchungen (s. Tabelle 3.6) und zum anderen mit HES-HEMA für Mikropartikelproduktion (s. Absatz 3.2.2).

In den Abbildungen Abbildung 4.39 Abbildung 4.40 sieht man einen Verlust der Antikörper- und Fluoreszenzaktivität abhängig von der Konzentration des Photoinitiators. Bei einer Photoinitiatorkonzentration von 60 ppm beträgt der Verlust ca. 60 %. Wird der Photoinitiator in einer Konzentration von 45 ppm eingesetzt verringert sich der Verlust auf 55 %, bei 30 ppm (der halben der üblich eingesetzten Konzentration) auf 43 %. Wird die Konzentration auf 15 ppm im Gesamtsystem reduziert (ein Viertel der Anfangskonzentration) beträgt der Verlust 36 %.





**Abbildung 4.39:** Einfluss von verschiedenen Photoinitiatorkonzentrationen auf die Antikörperaktivität der wässrigen Zweiphasensysteme vor und nach UV-Bestrahlung: dunkle Balken - vor Bestrahlung, helle Balken - nach Bestrahlung: 1 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator 60 ppm; 2 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator 45 ppm; 3 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator 30 ppm; 4 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator 15 ppm

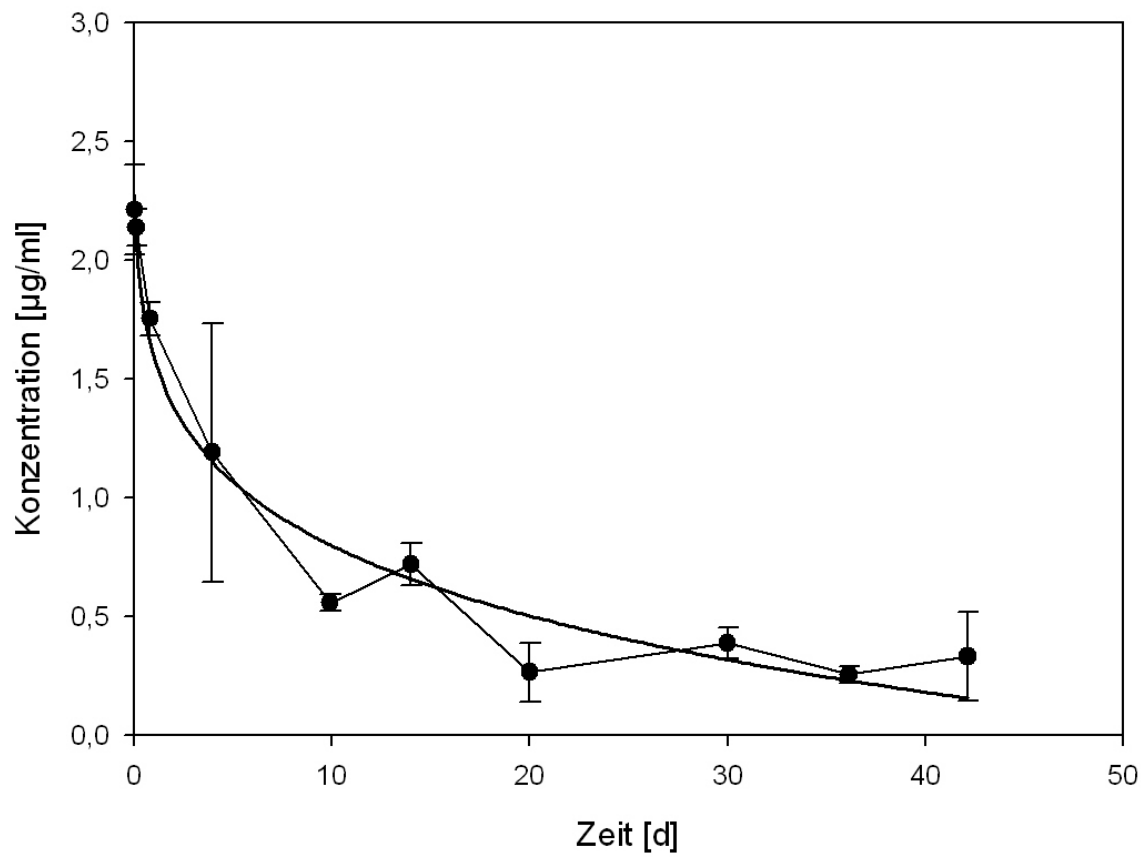


**Abbildung 4.40:** Einfluss von verschiedenen Photoinitiatorkonzentrationen auf die Fluoreszenzaktivität der wässrigen Zweiphasensysteme vor und nach UV-Bestrahlung: dunkle Balken - vor Bestrahlung, helle Balken - nach Bestrahlung: 1 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator 60 ppm; 2 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator 45 ppm; 3 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator 30 ppm; 4 wässriges Zweiphasensystem mit Photoinitiator 15 ppm

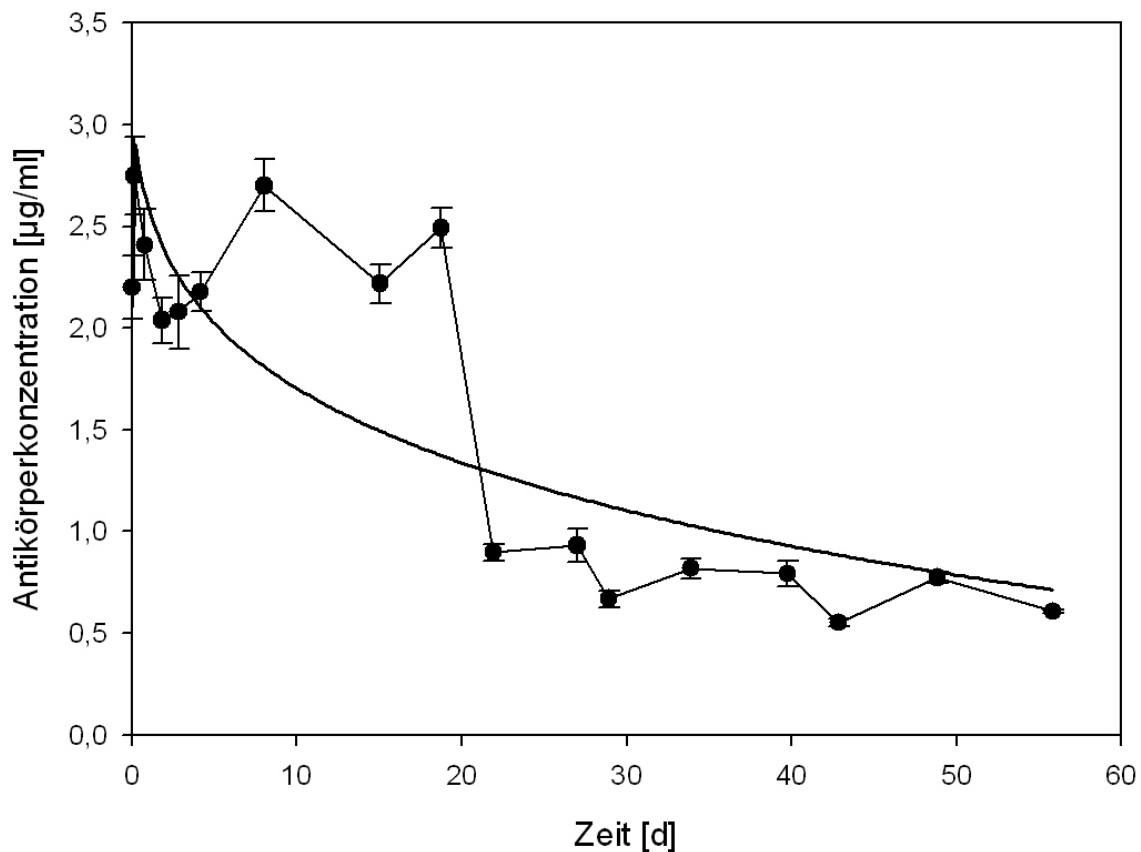
Offensichtlich ist der Photoinitiator als Radikalbildner für den Verlust der Antikörperaktivität und der Fluoreszenzaktivität verantwortlich. Die gebildeten Radikale können den Antikörper angreifen, was unter anderem zu Denaturierung führen kann, also zu einer Veränderung der Konformation des Antikörpers. Verbunden ist dies mit einer Änderung der spezifischen Bindungsregion, wodurch eine Antigenbindung unmöglich wird [67]. Weiterhin kann der Antikörper nach radikalischem Angriff durch Dimerisierung, Oxidation und Isomerisierung geschädigt werden. Da in dieser Arbeit der Antikörper nur auf seine Bindungsaktivität im ELISA überprüft wurde, kann die tatsächliche Ursache des Aktivitätsverlusts allerdings nicht geklärt werden.

Das Ausmaß der Instabilität unterschied sich signifikant zwischen einer wässrigen Antikörper-/Photoinitiator Lösung und einem wässrigen Zweiphasensystem mit gleichen Konzentrationsverhältnissen. Der nahezu vollständige Verlust der Antikörperaktivität in rein wässriger Lösung lässt sich damit erklären, dass der Antikörper als alleiniger Reaktionspartner für entstandene Radikale vorliegt. In einem wässrigen Zweiphasensystem liegen Polymere vor, die einerseits den Antikörper sterisch abschirmen, andererseits eine radikalische Ladung an die Polymerstruktur abgegeben können [109]. In den Untersuchungen wurde HES an Stelle von HES-HEMA eingesetzt. Da die HEMA Seitenkette von HES-HEMA eine elektrophile Doppelbindung in  $\alpha,\beta$ -Position zu einer Carbonylgruppe besitzt, die über radikalische Additionsreaktion mit weiteren Doppelbindungen vernetzt werden kann, kann angenommen werden, dass der negative Einfluss der Radikale im HES-HEMA/ PEG-System noch geringer ist als im HES/ PEG-System.

Die Antikörperaktivität leidet zusätzlich unter den Bedingungen der Freisetzungsversuche in Natriumphosphatpuffer (37 °C, Schütteln) (s. Abbildung 4.41). Gelöst in Serum erfährt die Aktivität im Vergleich zum Natriumphosphatpuffer eine langsamere Abnahme bei 37 °C (s. Abbildung 4.42).



**Abbildung 4.41: Abnahme der Antikörperkonzentration in Natriumphosphatpuffer gemessen mittels ELISA**



**Abbildung 4.42: Abnahme der Antikörperkonzentration in Serum gemessen mittels ELISA**

Bei Temperaturen von 37 °C kommt es im Laufe der Zeit zu Denaturierungen und Aktivitätsabnahme der Antikörper. Typische Einflüsse von erhöhter Temperatur sind oxidative Prozesse, Aufspalten von Disulfidbrücken und Aggregationen [67].

In Serum herrschen durch die Gegenwart von anderen Proteinen und Salzen physiologische und proteinfreundliche Bedingungen, unter denen die Antikörperaktivität länger stabil bleibt. Durch den Überschuss an Fremdproteinen im Serum ist die Wahrscheinlichkeit für negative Einflüsse wie unspezifische Oberflächenabsorption, Aggregation und Abbau durch Proteasen auf den Antikörper geringer [69].

#### 4.5.2 Antikörperfreisetzung

Um die Möglichkeit zu schaffen Mikropartikel auch mit geringeren Konzentrationen des Photoinitiators zu untersuchen wurden Chargen mit verschiedenen Konzentrationen an Photoinitiator hergestellt und bezüglich ihrer Partikelgröße und ihres Freisetzungsverhalten charakterisiert.

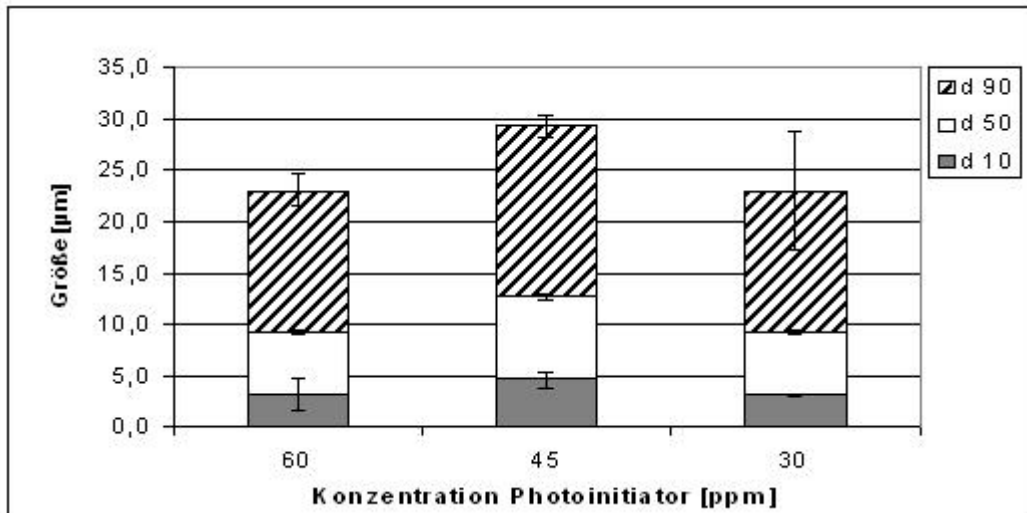
Die Ausbeute an Mikropartikeln nahm mit sinkendem Photoinitiatorgehalt ab; bei 15 ppm Photoinitiator konnten keine Mikropartikel gebildet werden (s. Tabelle 4.10).

**Tabelle 4.10: Mikrosphärenausbeute bei Variation der Photoinitiatorkonzentration**

<b>Gehalt Photoinitiator pro Mikrosphärencharge [ppm]</b>	<b>Ausbeute [mg]</b>
60	120 ±15
45	87 ±12
30	50,7 ±11
15	0

Durch eine geringere Photoinitiatorkonzentration ist es möglich, dass unvernetzte Anteile des HES-HEMA bei der Aufreinigung ausgewaschen werden und dadurch die Ausbeute an Mikropartikeln abnimmt. Liegt die Konzentration bei 15 ppm bleibt HES-HEMA soweit unvernetzt, dass es zu keiner Ausbildung der Mikropartikel kommt und die HES-HEMA-Phase nach der UV-Belichtung weiterhin als flüssige Polymerphase vorliegt.

Die Partikelgrößenverteilung zeigt sich weitgehend unabhängig von der Photoinitiatorkonzentration (s. Abbildung 4.43), wodurch man darauf schließen kann, dass der Photoinitiator keinen steuernden Einfluss auf die Tröpfchengröße der HES-HEMA/ PEG-Emulsion hat.



**Abbildung 4.43: Partikelgrößenverteilung bei abnehmender Photoinitiatorkonzentration**

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Stabilitätsuntersuchungen mit Natriumphosphatpuffer und Serum als Akzeptormedium wurden die zugehörigen Freisetzungsuntersuchungen in Serum durchgeführt.

Die Proben aus den Freisetzungsversuchen wurden zum einen mittels ELISA auf aktiven Antikörper untersucht (s. Abbildung 4.44), zum anderen wurde die Fluoreszenzaktivität ermittelt (s. Abbildung 4.45).

Die Freisetzungsverläufe aus den Hydrogelen, die mit geringerer Photoinitiatorkonzentration hergestellt wurden, zeigen ein schnelleres und nahezu vollständiges Freisetzen im Vergleich zum Mikrosphärenansatz mit 60 ppm Photoinitiator. Diese Verläufe zeigen sich in den Freisetzungskurven, die durch ELISA-Messungen und durch Fluoreszenzmessungen ermittelt wurden.

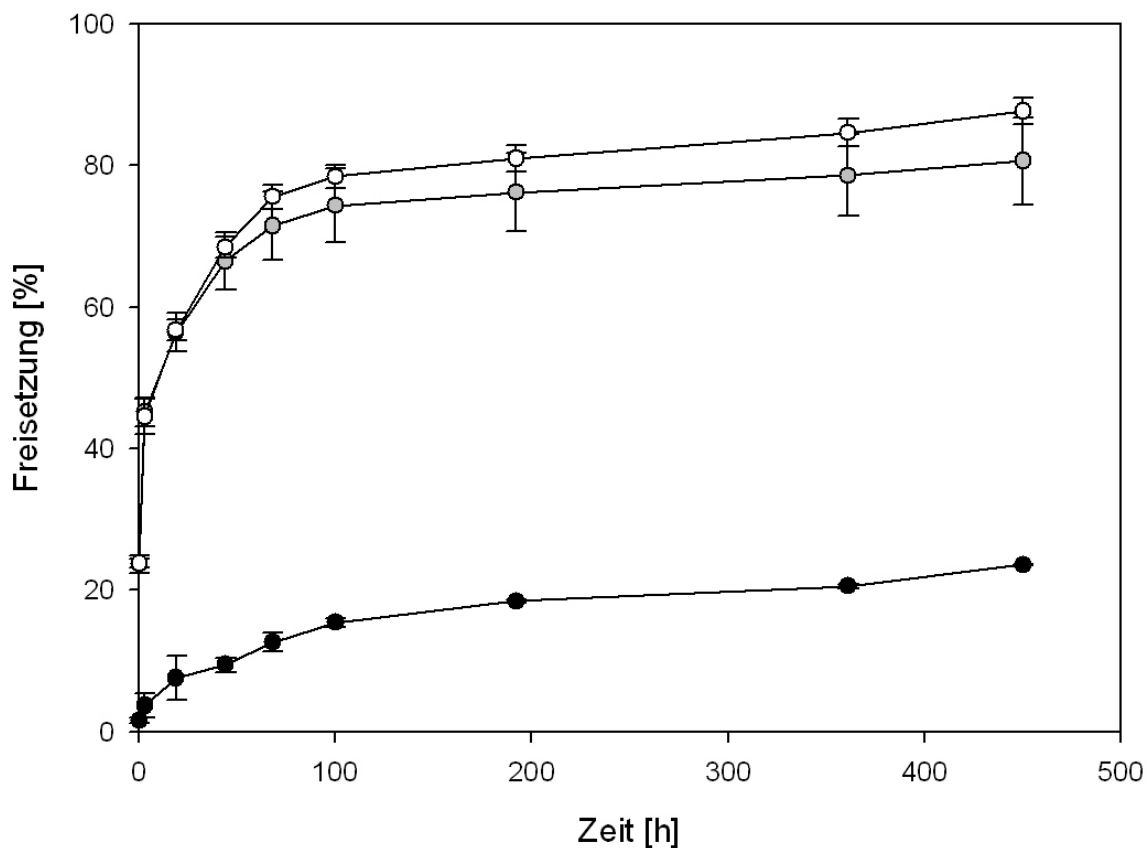
Die Standardabweichungen in den Fluoreszenzmessungen sind deutlich stärker ausgeprägt als bei den ELISA-Messungen, was auf die Trübung und die Schaumbildungsneigung des Serums zurückzuführen ist (s. Absatz 4.2.3).

Hydrogelmikrosphären, die mit einer geringeren Photoinitiatorkonzentration hergestellt wurden, besitzen im Vergleich zu der Standardrezeptur vermutlich ein weniger stark ausgebildetes Netzwerk. Die Freisetzung der eingeschlossenen Substanz kann daher schneller erfolgen, da die Diffusion weniger behindert ist. In einem weitmaschigeren Netzwerk sind die HES-HEMA Stränge für die im Serum enthaltene alpha-Amylase besser zugänglich und der Abbau des Netzwerkes kann

wiederum schneller erfolgen als bei den Hydrogelmikrosphären aus der Standardrezeptur (s. auch Absatz 4.2.3 ).

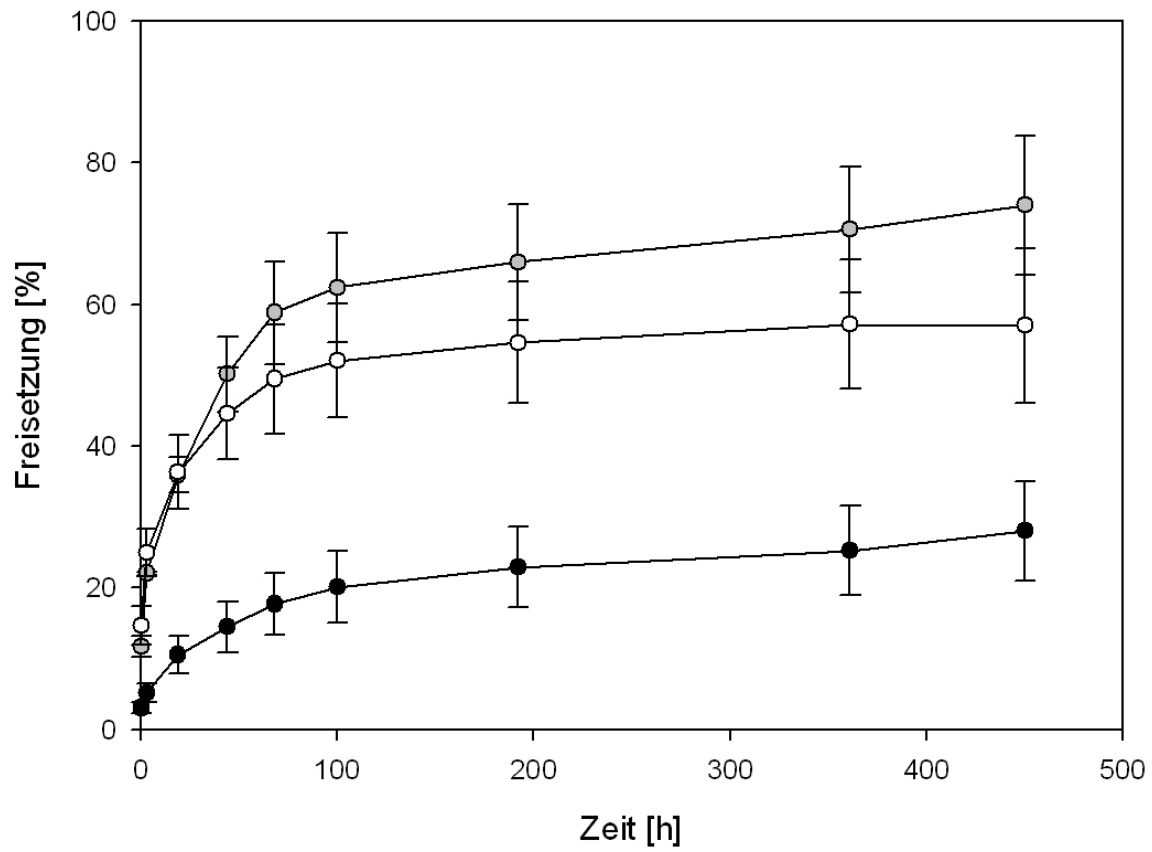
Die Fluoreszenz- und ELISA-Freisetzungskurven verlaufen ähnlich, was dafür spricht, dass der Antikörper mit einer unbeschadeten aktiven Bindungsstelle freigesetzt wird.

Die Versuche mussten auf Grund des mikrobiellen Wachstums nach ca. 480 Stunden abgebrochen werden. Eine Aussage, ob die Freisetzung bei dem weniger vernetzten Hydrogel vollständig verlaufen würde und in welchem Zustand das noch verbleibende Protein im Hydrogel vorliegt, kann daher zurzeit noch nicht getroffen werden.

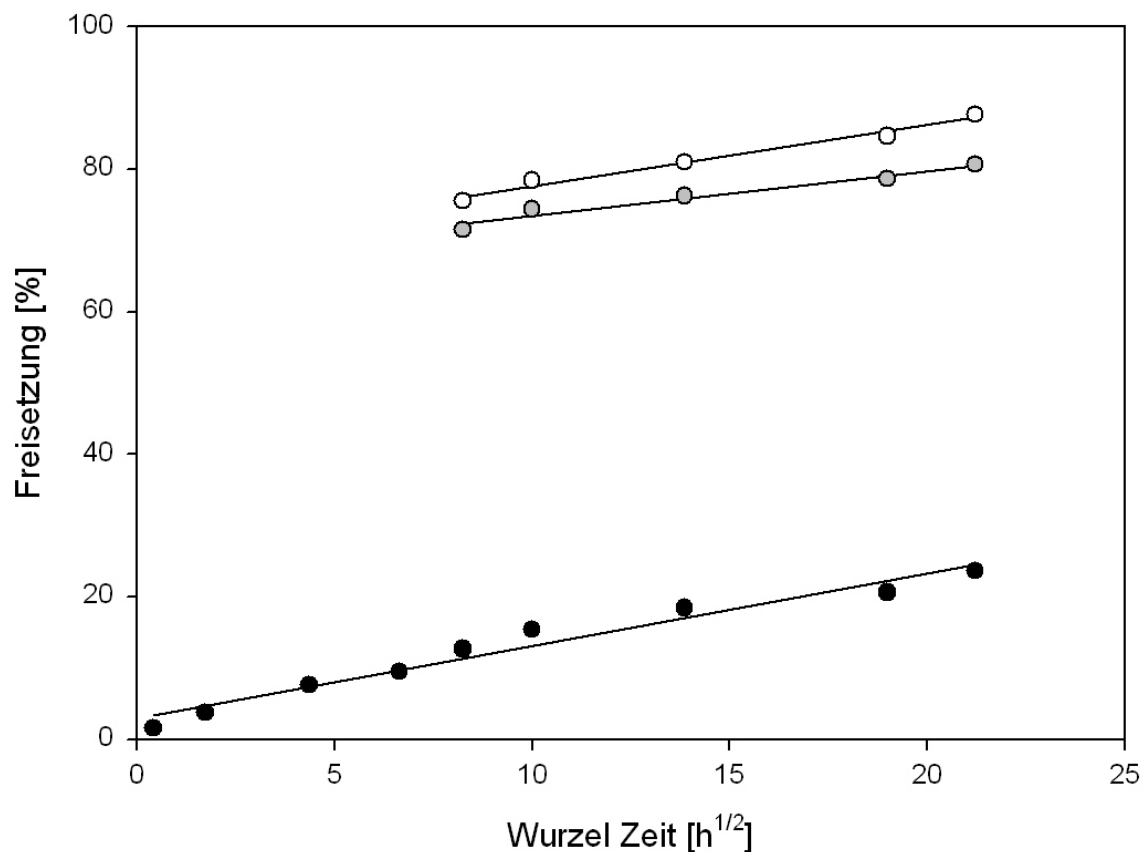


**Abbildung 4.44:** Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Antikörper gemessen mittels ELISA aus Mikrosphären (DS 0,05) hergestellt mit 60; 45; 30 ppm Photoinitiator; Akzeptormedium: Serum, ○ 30 ppm Photoinitiator, ● 45 ppm Photoinitiator, ● 60 ppm Photoinitiator





**Abbildung 4.45:** Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Antikörper gemessen mittels Fluoreszenzbestimmung aus Mikrosphären (DS 0,05) hergestellt mit 60; 45; 30 ppm Photoinitiator; Akzeptormedium: Serum, ○ 30 ppm Photoinitiator, ● 45 ppm Photoinitiator, ● 60 ppm Photoinitiator

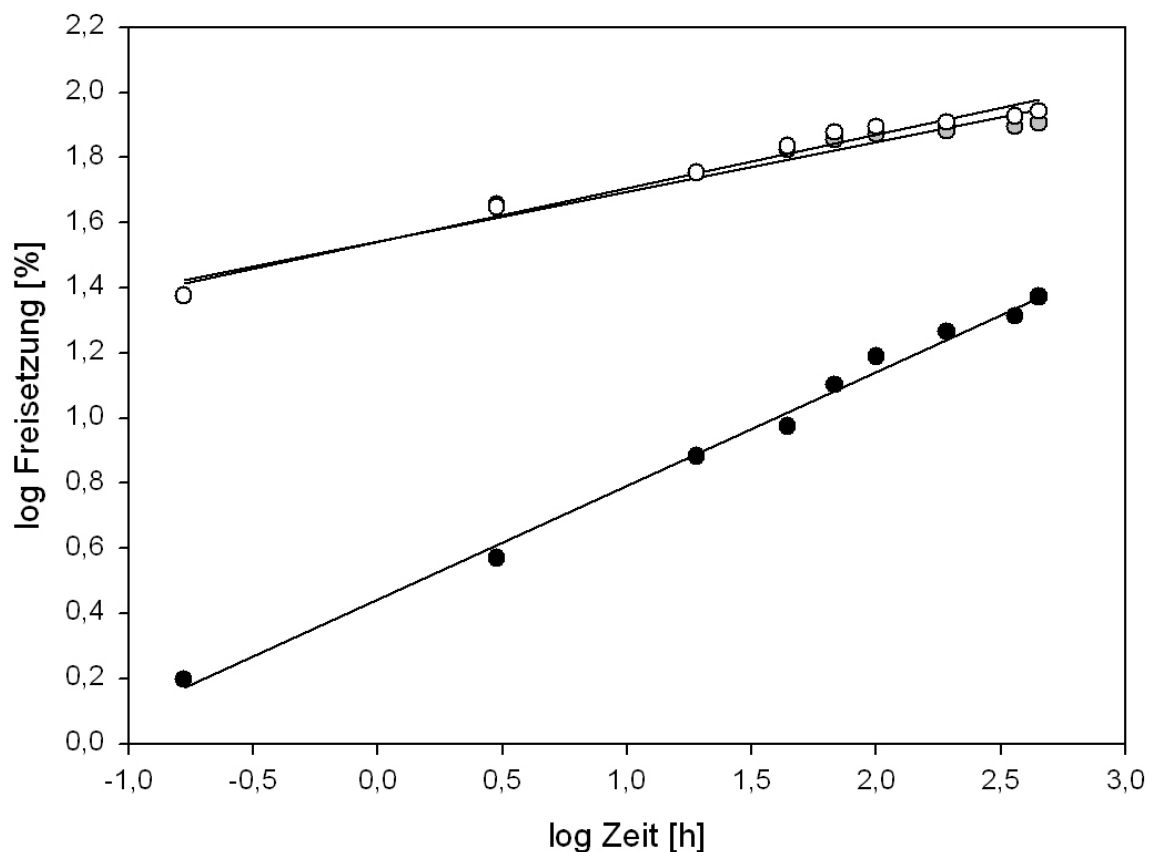


**Abbildung 4.46:** Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Antikörper gemessen mittels ELISA aus Mikrosphären (DS 0,05) hergestellt mit 60; 45; 30 ppm Photoinitiator; Akzeptormedium: Serum, ○ 30 ppm Photoinitiator, ● 45 ppm Photoinitiator, ● 60 ppm Photoinitiator in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit

**Tabelle 4.11:** Diffusionskoeffizient von FITC-markiertem Anti-BSA aus Mikrosphären hergestellt mit unterschiedlichem Gehalt an Photoinitiator

Initiator-konz	Geradengleichung aus Abbildung 4.14	Diffusionskoeffizient	Initiale Freisetzung [%]	Bestimmtheitsgrad $R^2$
60 ppm	$y = 1,0215x + 2,8578$	1,022	2,86	0,963
42 ppm	$y = 0,8547x + 69,117$	0,855	69,12	0,982
28 ppm	$y = 0,6269x + 67,214$	0,627	67,21	0,963

Vergleicht man die Werte für den Diffusionskoeffizienten und die initiale Freisetzung bei Einsatz unterschiedlicher Mengen an Photoinitiator, so fällt auf, dass die Werte für die Mikrosphären mit 60 ppm stark von denen mit 42 bzw 28 ppm abweichen. Bei geringerem Gehalt an Photoinitiator liegt die initiale Freisetzung bei ca 70 %. Der hydrodynamische Durchmesser von IgG beträgt ca. 11,6 nm [115]. Das Netzwerk welches unter diesen Bedingungen aufgebaut wurde, besteht also aus mindestens 67 % Strukturen mit Poren über 11,6 nm. Da der Anteil an initial freigesetztem Antikörper auch größer sein kann (strukturell verändertes Protein welches nicht nachgewiesen wurde/ s.o.) ist dieser Wert nur als Annäherung zu betrachten. Diese geringe Netzwerkdichte resultiert aus einer unvollständigen Vernetzung durch zu geringe Photoinitiatorkonzentration. Die ermittelten Werte bei dem System mit 60 ppm sollte man in diese Diskussion nicht einbeziehen, da hier mit großer Wahrscheinlichkeit ein bedeutender Anteil durch die Wechselwirkung mit dem Photoinitiator nicht mehr nachweisbar ist. Hier kann man aus den Ergebnissen von Absatz 4.2.3 aus Versuchen mit FITC-Dextran Rückschlüsse auf die Netzwerkbeschaffenheit ziehen. Der hydrodynamische Durchmesser von IgG liegt mit 11,6 nm zwischen dem von FD 70 und FD 500 (6,6 bzw. 17,8 nm). Im Hydrogel können demnach nur weniger als 10 % der Poren eine Größe von 11,6 nm besitzen. Die Netzwerkdichte ist also durch die reduzierte Photoinitiatorkonzentration deutlich geringer als bei dem Einsatz von 60 ppm Initiator.



**Abbildung 4.47:** Freisetzung von fluoreszenzmarkiertem Antikörper gemessen mittels ELISA aus Mikrosphären (DS 0,05) hergestellt mit 60; 45; 30 ppm Photoinitiator; Akzeptormedium: Serum, ○ 30 ppm Photoinitiator, ● 45 ppm Photoinitiator, ● 60 ppm Photoinitiator in logarithmischer Darstellung

**Tabelle 4.12:** Geradengleichungen und Bestimmtheitsgrade aus den Potenzgesetzberechnungen der Freisetzung nach Peppas für FITC-markiertes Anti-BSA aus Mikrosphären hergestellt mit unterschiedlichem Gehalt an Photoinitiator

Initiator-Konz.	Geradengleichung $\lg \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = \lg k + n \cdot \lg t$	Diffusionsexponent n	Bestimmtheitsgrad $R^2$
60 ppm	$y = 0,3498x + 0,443$	0,350	0,994
42 ppm	$y = 0,1643x + 1,5416$	0,1643	0,974
28 ppm	$y = 0,1528x + 1,5426$	0,153	0,959

---

Die Diffusionsexponenten für die Freisetzung von FITC-Anti-BSA aus Tabelle 4.12 sprechen für eine diffusionsgesteuerte Freisetzung aus dem Hydrogel bei geringem Einsatz von Photoinitiator (s. Absatz 2.3), was die Theorie von unvollständig vernetzten Hydrogel bestätigt.

Würden die Herstellungsbedingungen ein strukturell verändertes Protein entstehen lassen, wäre dies für ein pharmazeutisches Freisetzungssystem nicht akzeptabel, da die Allergenität oder die pharmakologische Wirkung solcher Strukturen nicht zu vernachlässigen und schwer vorherzusehen sind.

Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern sollte im Vergleich von Fluoreszenzmessungen und Antikörperaktivitätsmessungen ein Rückschluss auf das Verhältnis zwischen freigesetzten strukturell veränderten und funktionellen Antikörpern erhalten werden. Die Fluoreszenzaktivität leidet allerdings in gleicher Weise wie die Antikörperaktivität unter dem Einfluss von Photoinitiator und UV-Licht, so dass eine abschließende Bewertung nicht möglich ist

## 5 Abschlussdiskussion

Der Arbeit liegt das übergeordnete Ziel des Sonderforschungsbereiches 578 „Vom Gen zum Produkt“ zu Grunde, ein Freisetzungssystem für pharmazeutisch wirksame Proteine zu entwickeln. Ein weiterer Grundlagenbeitrag der Arbeit lag daher in der Erforschung der biologischen Aktivität von Proteinen nach der Freisetzung.

Therapeutisch aktive Proteine haben aufgrund ihrer spezifischen und potenten Wirkung einen großen Nutzen in der medizinischen Behandlung. Für die Pharmazeutische Technologie stellen sie aber immer noch eine große Herausforderung dar. Grund dafür ist ihre geringe Stabilität gegenüber Umgebungsbedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration, Scheerstress, Lösungsmittel etc) und Oberflächenwechselwirkungen [2, 106]. Die Instabilität äußert sich bei Proteinen in einem Wirkverlust, der in den meisten Fällen durch eine Konformationsänderung ausgelöst wird.

Ein Freisetzungssystem für Proteine sollte daher geringen Stress auf die einzuschließenden Proteine ausüben und das Protein in gleichmäßigen Mengen aus der Matrix abgeben um einen konstanten Wirkstoffspiegel zu erreichen.

Diese Herausforderung wurde in dieser Arbeit mit der Optimierung und Charakterisierung eines mikropartikulären System auf Basis von Hydroxyethylstärke angegangen. Die HES-HEMA-Mikropartikel können aufgrund ihrer chemischen Struktur und ihres Wassergehalts den Hydrogelen zugeordnet werden. Hydrogele weisen durch ihren hohen Wassergehalt eine proteinfreundliche Umgebung auf [10]. Das Herstellungsverfahren für die Mikropartikel verläuft in Gegenwart der Proteine und hat den Vorteil, dass auf Lösungsmittel und extreme pH- oder Temperaturwerte verzichtet werden kann.

Um die Eignung des Systems für die Freisetzung von Proteinen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Untersuchungsmethoden angewendet.

Die Partikel wurden hinsichtlich ihrer Netzwerkdichte, Partikelgrößenverteilung, Einschlusseffizienz und Freisetzungsverhalten analysiert. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die eingeschlossenen Proteine nach Freisetzung aus den Hydrogelen ihre volle biologische Aktivität aufweisen. Hierzu wurden Wechselwirkungen von Antikörper mit Bestandteilen des Herstellungsprozesses

untersucht sowie in Hydrogel eingeschlossene und wieder freigesetzte Antikörper auf ihre Aktivität getestet.

In der abschließenden Diskussion wird auf die Punkte Netzwerkdicke und Antikörper /Proteine als bedeutende Aspekte in der Arbeit eingegangen.

## 5.1 Netzwerkdicke

Die Eigenschaften von Hydrogelmikrosphären und Hydrogelzylindern aus HES-HEMA zeigen eine starke Abhängigkeit von der Netzwerkdicke, die über den Substitutionsgrad (DS-Wert) der zugrunde liegenden HES-HEMA-Polymere eingestellt werden kann. Zusätzlich werden die Eigenschaften durch die Ausbildung kanalartiger Poren beeinflusst. Diese entstehen durch eine Phasenseparation während der Gelbildung und sind bei gut löslichen Ausgangspolymeren (kleiner DS) weniger stark ausgeprägt. Der DS der HES-HEMA-Polymere kann bei ihrer Herstellung gesteuert werden und bietet auf diese Weise eine gute Möglichkeit die Eigenschaften der Gele einzustellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss der Netzwerkdicke durch verschiedene Methoden charakterisiert werden.

Zum einen zeigte sich bei allen Freisetzungsversuchen eine stärkere Retention mit höherer Netzwerkdicke. Bei rein diffusionsgesteuerter Freisetzung lässt sich eine behinderte Diffusion mit abnehmender Porosität durch eine erhöhte Netzwerkdicke über das Fick'sche Diffusionsgesetz erklären (s. Gleichung 3.1)

Ist die Porengröße in dem Hydrogel kleiner als der hydrodynamische Durchmesser der freizusetzenden Substanz, kann keine Diffusion erfolgen. Da in den Hydrogelen aber Strukturen mit unterschiedlicher Porosität vorliegen und die Porengröße polydispers ist, wird eine Teilfraktion der Substanz schneller über Diffusion aus dem Gel freigesetzt, während aus den stärker vernetzten Bereichen die Freisetzung erst nach Degradation erfolgen kann; es ergibt sich ein ausgeprägt zweiphasiger Freisetzungsverlauf.

Die Geschwindigkeit der Degradation ist ebenfalls abhängig von der Netzwerkdicke. Dies konnte in den Freisetzungsversuchen aus Mikrosphären in Natrium-carbonatpuffer beziehungsweise Serum nachgewiesen werden sowie durch MRX-Untersuchungen an Hydrogelzylindern in alpha-Amylase Lösung untermauert

werden. Bei alkalischer Hydrolyse ist die Zahl der Carbonatestergruppen entscheidend, die bei einem hohen DS in größerer Zahl vorliegen. Nach Hydrolyse der Vernetzungspunkte kommt es zu einer Erhöhung der Maschenweite und dadurch zu einer beschleunigten Diffusion aus dem Gel (s. Abbildung 5.1).

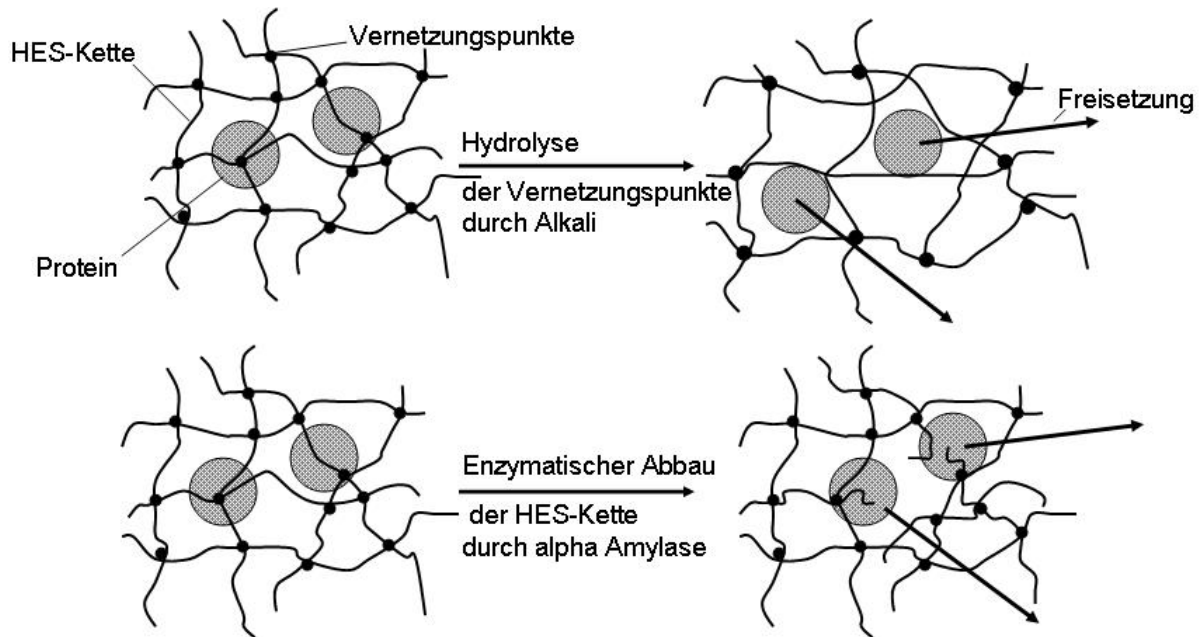
Der enzymatische Abbau des Hydrogels durch  $\alpha$ -Amylase erfolgt durch Spaltung des HES-Rückgrats an der  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindung (s. Abbildung 5.1). Der Einfluss der Netzwerkdichte besteht hierbei in der sterischen Zugänglichkeit der glykosidischen Bindung für das Enzym. In einem hochvernetzten Hydrogel liegen die einzelnen Polymerstränge dicht aneinander. Dadurch kann das HES-Rückgrat von dem Enzym schlechter angegriffen werden. Mit zunehmendem Abbau wird die glykosidische Bindung für das Enzym besser zugänglich durch eine Aufweitung der Maschenweite.

Eine weitere sterische Behinderung für einen enzymatischen Angriff bei einem Hydrogel mit hohem DS sind die Seitenketten, die durch die Vernetzung der Methacrylgruppe ausgebildet werden, in deren unmittelbarer Nähe eine Anlagerung des Enzyms erschwert sein kann.

Durch den Abbau des HES-Rückgrats entstehen wiederum größere Poren und eine weniger behinderte Diffusion, wodurch eingeschlossene Substanzen beschleunigt freigesetzt werden können (s. Absatz 4.2.4 und 4.4).

In den MRX-Untersuchungen wurde eine alkalische  $\alpha$ -Amylaselösung zum Abbau der Hydrogelzylinder eingesetzt. Die Gele wurden also über alkalische Hydrolyse sowie enzymatisch abgebaut. Die Änderung der Beweglichkeit der eingeschlossenen MNPs zeigte während der Untersuchung Unterschiede bei verschiedenen Netzwerkdichten auf. Die MNPs erreichen eine schnellere Zunahme der Beweglichkeit in Hydrogelen mit niedriger Netzwerkdichte. Die Beobachtungen aus den Freisetzungsversuchen stimmen im Grundsatz mit denen der MRX-Untersuchungen überein (s. Absatz 4.3).





**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung des Unterschiedes zwischen der alkalischen Hydrolyse der Vernetzungspunkte der HES-HEMA-Hydrogele und dem enzymatischen Abbau des HES-Rückgrats durch alpha-Amylase (modifiziert nach Fransen et al. [57])

## 5.2 Antikörper/Proteine

Die Entwicklung eines geeigneten Freisetzungssystems für den Einschluss von Antikörpern und Proteinen stellt auf Grund ihrer geringen Stabilität eine besondere Herausforderung dar. Zu einem Funktionsverlust der Wirkstoffe führen Denaturierungen, Aggregation, Oberflächenadsorption, Deamidierung, Oxidation, Isomerisierung und Fragmentierung. In den hier beschriebenen Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem Anti-BSA in einer wässrigen Lösung von Antikörper und Photoinitiator ist nach Anregung des Initiators mit UV-Licht ein massiver Aktivitätsverlust des Antikörpers aufgetreten. Da es sich bei der Aktivierung des Photoinitiators um eine Radikalbildung handelt, ist der Aktivitätsverlust vermutlich Folge von einer Reihe von Schädigungen der Antikörper. Bekommt das Protein durch den Angriff des Radikals selbst einen radikalischen Charakter, entspricht dies in erster Linie einer Oxidation. Da die entstehende Formation in der Regel instabil ist, kann dies zu weiteren Reaktionen führen, in deren Folge es zu Konformationsänderungen kommen kann. Eine Dimerisierung zweier radikalischer

Antikörpermoleküle ist ebenso denkbar wie die Kopplung neuer Bindungen innerhalb der Tertiärstruktur.

Bei Freisetzungsversuchen in Serum kann aus dem HES-HEMA-Molekül über Abbau durch  $\alpha$ -Amylase Glucose entstehen. Bei 37 °C und pH 7,4 kann der Antikörper durch eine Maillard-Reaktion glykolisiert werden [116]. Diese glykolisierten Antikörper zeigen in Arbeiten von Kennedy et al. eine verstärkte Dissoziationsneigung der Antikörper-Antigen-Bindung.

Die Freisetzungsversuche, in denen Antikörper in Hydrogele unter geringerem Photoinitiatoreinsatz eingeschlossen wurden, zeigen eine relativ rasche Freisetzung bis ca. 80% der eingesetzten Menge. Da die Freisetzungsversuche aufgrund der mikrobiellen Belastung des Serums abgebrochen werden mussten, ist eine Aussage, ob eine 100%ige Freisetzung erreichbar ist, nicht möglich. Da ein gewisser Verlust der Antikörperaktivität durch die Produktion der Partikel und durch die Freisetzungsbedingungen zu erwarten ist, wird davon ausgegangen, dass der freigesetzte Antikörper nicht zu 100% über ELISA und Fluoreszenz zu detektieren ist. In welcher Form der inaktive Antikörper in den Partikeln verbleibt oder freigesetzt wird, wäre für eine spätere Zulassung allerdings von Bedeutung. Da jeder Antikörper unterschiedlich stabil ist und verschiedene Eigenschaften aufweist, lassen diese Ergebnisse keine allgemeine Aussage über eine Eignung des HES-HEMA-Hydrogels als Drug Delivery System zu.

Der hydrodynamische Durchmesser von IgG beträgt ca 11,6 nm [115]. Vergleicht man die Freisetzung von FITC-Dextran 70 kDa mit der Freisetzung von Antikörpern aus Hydrogelpartikeln in humanem Serum, verläuft bei gleicher Herstellungsweise (Photoinitiatorkonzentration) die Freisetzung des kleineren FITC-Dextrans (hydrodynamischer Durchmesser 6,6 nm) deutlich schneller. Die größeren Antikörper werden stärker durch die behinderte Diffusion retardiert.

### 5.3 Fazit

Das in dieser Arbeit eingesetzte HES-HEMA-System steht im Wettkampf mit einem ähnlichen mikropartikulärem System auf Basis der Arbeitsgruppe Franssen et. al. Diese Arbeitsgruppe hat bereits 1999 Freisetzungssystem auf Basis von DEX-HEMA entwickelt und charakterisiert.

Die Freisetzung von IgG aus Mikropartikeln aus DEX-HEMA ist auch bei einem hohen DS ohne abbauende Enzyme innerhalb von 25 Tagen abgeschlossen [57].

Der Freisetzungsverlauf ist bei den DEX-HEMA-Mikrosphären sigmoidal, ein Burst-Release ist nicht zu beobachten. Diese Unterschiede zwischen den Eigenschaften von DEX-HEMA und HES-HEMA lassen sich vermutlich durch die Unterschiede im Ausgangsmaterial (Löslichkeit, Struktur) erklären.

Dextran ist ein Polysaccharid aus Glucosmolekülen ähnlich dem Amylopektin, nur sind in diesem Polymer auch  $\alpha$ -1-2;  $\alpha$ -1-4 und  $\alpha$ -1-6 Verzweigungen möglich, wobei allerdings die  $\alpha$ -1-6 Verknüpfung dominiert [117].

HES ist aus Amylopektin hergestellt, hier sind die Hauptketten alpha 1-4-glykosidisch verknüpft und mit Seitenketten über eine ein alpha 1-6-glykosidische Bindung. Zusätzlich sind in diesem Polysaccharid einige der Hydroxylgruppen mit Ethylenoxid verethert [118].

Im Vergleich zu HES ist Dextran mit relativ wenigen Verzweigungen eher fadenförmig, wodurch DEX-HEMA selbst bei einem mit HES-HEMA vergleichbaren DS immer eine weniger verwobene Struktur besitzt [89, 119].

Durch die unterschiedliche Löslichkeit der DEX-HEMA und HES-HEMA lässt sich der Freisetzungsverlauf der jeweiligen Freisetzungssysteme erklären. HES-HEMA besitzt eine relativ geringe Wasserlöslichkeit, weshalb es während der Polymerisation - also der Gelbildung – zur Überschreitung der Löslichkeitsgrenze kommt und das Polymer partiell ausfällt. Dadurch wird das Auftreten der kanalartigen Porenstruktur erklärt und der dadurch resultierende biphasische Freisetzungsverlauf. Bei dem besser wasserlöslichen DEX-HEMA tritt dieses Phänomen vermutlich nicht oder nur in geringem Ausmaß auf und das resultierende Hydrogel zeigt eine gleichmäßige Struktur auf. Aus diesem homogenen Hydrogel können die eingeschlossenen Substanzen nach einer gewissen Quellung bzw. Degradation gleichmäßig freigesetzt werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Polymersystemen ist das Verhalten von unpolaren Substanzen in einem wässrigen Zweiphasensystem bestehend aus HES-HEMA bzw. DEX-HEMA und PEG. Das HES-HEMA System ist hierbei besser geeignet für die Anreicherung von unpolaren Substanzen in die HES-HEMA-Phase als eine DEX-HEMA-Phase. Dies zeigten vergleichbare Studien mit Lysozym in der Arbeitsgruppe um Johansson et al. [120] und Barisch et al. [121].

Der Einsatzbereich der HES-HEMA Hydrogele auf dem momentanen Forschungsstand sollte also den Eigenschaften des Gels entsprechen, also in Bereichen, wo ein biphasischer Freisetzungsverlauf mit hoher initialer Dosis und langer konstanter Freisetzung (Initial- und Erhaltungsdosis) einer geringen Menge Protein erforderlich ist.

Aufgrund der Partikelgröße der Mikrosphären ist eine subkutane oder intramuskuläre Applikation angebracht. Eine Einsatzmöglichkeit von makroskopischen Hydrogelen könnte, beladen mit Knochenwachstumshormonen (BMP-2), in der Anwendung bei Zahnimplantaten liegen.

Auf diese Weise könnte das Implantat durch das angeregte Knochenwachstum schneller im Kieferknochen verankert werden [122]. Denkbar wäre in diesem Fall eine Ausbildung des Hydrogels direkt in der Zahnkavität.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung von HES-HEMA-Hydrogelen als Freisetzungssystem für Proteine.

Hierzu wurden in erster Linie Hydrogelmikropartikel mit verschiedenen eingeschlossenen Testsubstanzen hergestellt und auf ihre Morphologie, Quellungseigenschaften, Einschlusseffektivität und Freisetzung untersucht. Bei den Partikeln handelt es sich um Sphären mit einer engen Partikelgrößenverteilung und einer Einschlusseffizienz von 44-68 % je nach eingesetzter Testsubstanz.

Der Einfluss der Herstellungsweise der Hydrogele wurde durch vergleichende Untersuchungen am Freisetzungsverhalten von Hydrogelmikrosphären und makroskopischen Hydrogelzylindern gezeigt werden.

Hydrogelzylinder zeigten aufgrund ihrer Herstellungsmethode und der sehr viel größeren Schichtdicke im Vergleich zu den Mikrosphären eine schnellere Freisetzung

Entscheidender Parameter hierfür ist die Netzwerkdicke der Hydrogele (DS), also die Anzahl der Vernetzungspunkte zwischen den Polymerketten.

Es hat sich gezeigt, dass Hydrogele mit Zunahme der Netzwerkdicke kleinere Partikelgrößen und eine geringere Quellungsneigung aufweisen und zudem die Testsubstanzen langsamer freisetzen. Mit zunehmendem Molekulargewicht der eingeschlossenen Substanz wird die Freisetzung verzögert, was durch Freisetzungsuntersuchungen mit drei unterschiedlich großen FITC-Dextranen nachgewiesen wurde.

Neben diesen Erkenntnissen wurde das MRX-Messverfahren als Charakterisierungsmethode für Hydrogele weiterentwickelt. Über die veränderte Beweglichkeit von eingeschlossenen magnetischen Nanopartikeln unter Einfluss von  $\alpha$ -Amylase und pH 9,6 lässt sich der Abbau des Hydrogels in Abhängigkeit der Netzwerkdicke beobachten und beschreiben.

Erste Freisetzungsuntersuchungen aus Mikrosphären wurden bei pH-Wert 7 durchgeführt. Innerhalb von 8 Tagen wurden maximal 50 % der gesamten eingeschlossenen Menge freigesetzt. Zur Beschleunigung der Freisetzung wurden Untersuchungen bei pH 9,6 und in humanem Serum durchgeführt. Im alkalischen

Milieu ist die Freisetzung von FITC Dextran aufgrund hydrolytischer Degradation des Netzwerks innerhalb von 250 Stunden abgeschlossen. Der enzymatische Abbau durch die im Serum enthaltene alpha-Amylase bewirkt ebenfalls eine rasche Freisetzung von FITC Dextran aus Hydrogelmikrosphären.

Auch bei degradativen Freisetzungsbedingungen zeigt sich eine Abhängigkeit vom Vernetzungsgrad der Hydrogele. Ein hochvernetztes Hydrogel weist eine höhere Anzahl von hydrolytisch spaltbaren Carbonatgruppen auf und erschwert die Zugänglichkeit für alpha-Amylase. Die Freisetzungsgeschwindigkeit nimmt mit Zunahme des DS unter allen Untersuchungsbedingungen ab.

Wird die alpha-Amylase in die Hydrogelpartikel eingearbeitet, kann der Abbau des Hydrogels durch die Zunahme reduzierender Enden im Hydrogel sowie eine Zunahme der Freisetzungsgeschwindigkeit mit zunehmender alpha-Amylase Konzentration beobachtet werden.

Um die biologische Aktivität nach der Freisetzung aus dem Hydrogel nachweisen zu können, wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt. Dadurch sollte im Vergleich von Fluoreszenzmessungen und Antikörperbindungsaktivität (ELISA) ein Rückschluss auf das Verhältnis von freigesetzten strukturell veränderten zu funktionalen Antikörpern gezogen werden können.

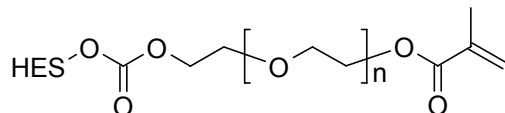
Einen negativen Einfluss auf die Antikörperaktivität zeigt der Photoinitiator Irgacure 2959<sup>®</sup> mit zunehmender Konzentration in einem Gemisch aus Natriumphosphatpuffer, Photoinitiator und Antikörper. Der denaturierende Einfluss fällt in einem wässrigen Zwei-Phasen-System bestehend aus HES, PEG, Photoinitiator und Antikörper sehr viel geringer aus. Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen wurden Hydrogelpartikel mit geringerer Photoinitiatorkonzentration hergestellt und in ihrem Freisetzungsverhalten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass ein größerer Anteil des Antikörpers aus den Hydrogelen freigesetzt wird, welche mit geringerer Photoinitiatorkonzentration hergestellt werden. Diese Ergebnisse lassen sich als eine Kombination aus einem höheren funktionsfähigen Anteil an Antikörper (durch geringere Schädigung) und einem weniger vernetzten Netzwerk durch geringere Initiatorkonzentration erklären.

Demnach ist eine Anwendung der nach dieser Methode hergestellten Hydrogele als Freisetzungssystem für Proteine vielversprechend.

## 7 Ausblick

Um HES-HEMA Hydrogele als effizientes Freisetzungssystem einsetzen zu können, müssen weitere Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen strukturellem Design und ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften gewonnen werden. Hierzu sind weitere Arbeiten im Bereich der Polymersynthese, technologische Optimierungen, Herstellung unter aseptischen Bedingungen sowie Qualitätskontrolle der Hydrogelsysteme und tiefer gehende Charakterisierung mit physiko-chemischen Methoden notwendig.

Zur Vermeidung der Phasenseparation während der Gelbildung, die zu den Porenstrukturen im Gel und dadurch zu einem biphasischen Verlauf führen, wurden bereits Polymere mit besserer Wasserlöslichkeit synthetisiert [123]. Dabei handelt es sich um HES-PEGMA-Derivate (Hydroxyethylstärke-Polyethylenglykol-Methacrylat) mit vier beziehungsweise acht PEG-Einheiten als Spacer (s. Abbildung 7.1). Diese Polymere zeigten in ersten Versuchen schon eine gute Wasserlöslichkeit. HES-4-PEGMA (mit 4 PEG Einheiten) Mikropartikel konnten bereits mit einer hohen Einschlusseffizienz von ca. 80% hergestellt werden.



**Abbildung 7.1: HES-PEGMA mit der Anzahl n an Ethylenoxidemolekülen**

Erstrebenswert erscheint auch die Entwicklung von Polymeren, welche über „Thioclick“ oder Michael-Addition polymerisieren können [124-126]. Durch Vermischung eines Zweikomponentensystems könnte so ohne Einsatz von (Photo)-initiatoren ein Hydrogel mit neuen Eigenschaften erhalten werden.

Diese Polymere sollen in folgenden Arbeiten auf ihr Verhalten im wässrigen Zwei-Phasensystem und die produzierte Gelkörper auf ihre Eigenschaften wie Freisetzungverhalten, Morphologie und Quellungseigenschaften untersucht werden. Neben der Variation der Hydrogelbildner auf chemischer Ebene soll auch die Möglichkeit einer Beeinflussung der Wirkstofffreisetzung durch technologische

Maßnahmen während der Hydrogelherstellung untersucht werden. Hierbei sollen zum einen größere Sphären durch die Anwendung eines Strahlschneiders (Jetcutter) [127] oder einer elektrostatischen Tropfmethode (electrostatic dropping) hergestellt werden, sowie durch die Entwicklung eines mikrofluidischen Systems monomodal verteilte Mikrosphären im Größenbereich von 10 µm erhalten werden [128]. Für das mikrofluidische System sind am Institut für Mikrotechnik der TU-Braunschweig bereits erste Prototypen auf Basis von Polydimethylsiloxan (PDMS) produziert worden.

Die Arbeiten mit Antikörpern sollen fortgeführt werden, wobei sich die Konzentrationen einzuschließender Antikörper an den therapeutischen Dosen orientieren sollen. Des Weiteren sind Untersuchungen geplant in denen verschieden große rekombinante Antikörperfragmente aus den Gelen freigesetzt werden.

Um Informationen über die Art des Aktivitätsverlustes durch den Einfluss von Photoinitiator und UV-Licht zu erhalten, wären weitere Untersuchungen denkbar.

In einer SDS-Gelelektrophorese könnte man Dimere oder Fragmente, die entstanden sind erkennen. Circular dichroismus kann Aufschluss über Konformationsänderungen innerhalb des Proteins geben. Über Massenspektrometrie ließen sich Abbaureaktionen feststellen.

Ausgewählte Systeme sollen tierexperimentell auf das Freisetzungs- bzw. Abbauverhalten sowie die physiologische Verträglichkeit untersucht werden. Hierzu sind Versuche an der Maus geplant, in denen die Formulierungen lokal (voraussichtlich subkutan oder intramuskulär) appliziert werden.

Die Vorgänge im Hydrogel bei Vernetzung und Abbau können durch MRX-Messungen an Mikrosphären ergänzt werden. Durch den Einsatz von speziell produzierten monomodal verteilten kleineren Eisennanopartikeln soll die Simulation des Einschlusses kleinerer Moleküle möglich werden [129].



## 8 Literaturverzeichnis

1. Granberg, A. and R. Stankiewicz, *Biotechnenology and the transformation of the pharmaceutical value chain and innovation system*, in *Medicon Valley BioConference*, M.V. Academy, Editor. 2002: Copenhagen.
2. Manning, M.C., K. Patel, and R.T. Borchardt, *Stability of protein pharmaceuticals*. *Pharm Res*, 1989. **6**(11): p. 903-18.
3. van Dijk-Wolthuis, W.N.E., et al., *Degradation and Release Behavior of Dextran-Based Hydrogels*. *Macromolecules*, 1997. **30**: p. 4639-4645.
4. Peppas, N.A., et al., *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000. **50**(1): p. 27-46.
5. Meyvis, T., et al., *On the release of proteins from degrading dextran methacrylate hydrogels and the correlation with the rheologic properties of the hydrogels*. *Pharm Res*, 2001. **18**(11): p. 1593-9.
6. Lawin, P., J. Zander, and B. Weidler, *Hydroxyethyl starch : eine aktuelle Übersicht*. 1989, Stuttgart: Thieme Verlag KG, Germany. 211.
7. Wichterle, O. and D. Lim, *Hydrophilic Gels for biological use*. *Nature*, 1960. **185**: p. 117-118.
8. Burger, A., Wachter, Helmut, *Hunnius- Pharmazeutisches Wörterbuch*. Vol. 8. 1998: de Gruyter. 1529.
9. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. **43**: p. 3–12.
10. Peppas, N.A., *Hydrogels in medicine and pharmacy*. 1986, Boca Raton, FL: CRC Press. 180.
11. Uchebu, I.F. and A.G. Schätzlein, *Polymers in Drug Delivery*. 2006, Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group. 259.
12. Berger, J., et al., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004. **57**(1): p. 19-34.
13. Mundargi, R.C., et al., *Sequential interpenetrating polymer network hydrogel microspheres of poly(methacrylic acid) and poly(vinyl alcohol) for oral controlled drug delivery to intestine*. *J Microencapsul*, 2008. **25**(4): p. 228-40.
14. Cavalieri, F., et al., *Novel PVA-based hydrogel microparticles for doxorubicin delivery*. *Biomacromolecules*, 2008. **9**(7): p. 1967-73.
15. Hyung Park, J. and Y.H. Bae, *Hydrogels based on poly(ethylene oxide) and poly(tetramethylene oxide) or poly(dimethyl siloxane). III. In vivo biocompatibility and biostability*. *J Biomed Mater Res A*, 2003. **64**(2): p. 309-19.
16. Bruck, S.D., *Aspects of Three Types of Hydrogels for Biomedical Applications*. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1973. **7**: p. 387-404.
17. van Dijk-Wolthuis, W.N.E., et al., *A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer*. *Polymer*, 1997. **38**(25): p. 6235-6242.
18. Van Tomme, S.R., et al., *Mobility of model proteins in hydrogels composed of oppositely charged dextran microspheres studied by protein release and fluorescence recovery after photobleaching*. *J Control Release*, 2005. **110**(1): p. 67-78.

19. Lin, C.C. and A.T. Metters, *Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(12-13): p. 1379-408.
20. Peppas, N.A., et al., *Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology*. Annu Rev Biomed Eng, 2000. **2**: p. 9-29.
21. Amsden, B., *Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models*. Macromolecules, 1998. **31**(23): p. 8382-8395.
22. Dong, L.C., A.S. Hoffman, and Q. Yan, *Dextran permeation through poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels*. J. Biomat. Sci. Polym. Ed., 1994. **5**(5): p. 473 - 484.
23. Li, J.K., N. Wang, and X.S. Wu, *A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery*. J Pharm Sci, 1997. **86**(8): p. 891-5.
24. Michalzik, M., et al., *Massensensitive Sensor-Fließsystem zur CRP-Diagnostik*, in *Mikrosystemtechnik Kongress*, VDE Verlag GmbH-Berlin-Offenbach. 2007: Dresden.
25. van der Linden, H.J., et al., *Stimulus-sensitive hydrogels and their applications in chemical (micro)analysis*. Analyst, 2003. **128**(4): p. 325-31.
26. Ayala, V.C., et al. *Design, Construction and Testing of a Monolithic pH Sensitive Hydrogel-Valve for Biochemical and Medical Application*. in *16th Argentine Bioengineering Congress and the 5th Conference of Clinical Engineering*. 2007: IOP Publishing Journal of Physics.
27. Eddington, D.T., Member, David J. Beebe, *A Valved Responsive Hydrogel Microdispensing Device With Integrated Pressure Source*. J. of Microelectronic Systems, 2004. **13**(4).
28. Segura, T., P.H. Chung, and L.D. Shea, *DNA delivery from hyaluronic acid-collagen hydrogels via a substrate-mediated approach*. Biomaterials, 2005. **26**: p. 1575–1584.
29. Leach, J.B. and C.E. Schmidt, *Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds*. Biomaterials, 2005. **26**(2): p. 125-35.
30. Burdick, J.A. and K.S. Anseth, *Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2002. **23**(22): p. 4315-23.
31. Beijerinck, M.W., *Ueber Emulsionsbildung bei der Vermischung wässriger Lösungen gewisser gelatinierender Kolloide*. Coll. & Polym. Sci., 1910. **7**(1): p. 16-20.
32. Fisher, D. and I.A. Sutherland, *Separations using aqueous phase systems- Applications in cell biology and biotechnology*. 1989, New York: Plenum Press.
33. Stenekes, R.J., et al., *The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of the formulation parameters on particle characteristics*. Pharm Res, 1998. **15**(4): p. 557-61.
34. Albertsson, P.-A., *Partitioning of Macromolecules*, in *Separations using aqueous two phase systems- Application in cell biology and biotechnology*. 1989, Plenum Publishing: New York.
35. Tjerneld, F., et al., *New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification*. Enzyme Microb. Technol., 1986. **8**: p. 417 - 423.
36. Scheibe, K., *Hydrogele auf der Basis von Hydroxyethylstärke als Drug Delivery Systeme für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen*, in *Institute for*

- pharmaceutical Technology*. 2007, Dissertation, Technische Universität Braunschweig: Braunschweig. p. 144.
37. Franssen, O. and W.E. Hennink, *A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents*. Intern. J. of Pharmaceutics, 1998. **168**: p. 1-7.
  38. Dobry, A. and F. Boyek-Kawenoki, *Phase Separation in Polymer Solution*. J. of Polym. Sci., 1947. **2**(1): p. 90-100.
  39. Voigt, R., *Pharmazeutische Technologie : für Studium und Beruf*. Vol. 10. 2006, Stuttgart: Dt. Apotheker-Verlag. 716.
  40. Bauer, K.H., K.H. Frömming, and C. Führer, *Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie mit einer Einführung in die Biopharmazie*. Vol. 8. 2006, Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges. 487.
  41. Flory, P.J., *Phase Equilibria in Polymer-Solvent Systems*. J. of the Am. Chem.Soc., 1952. **74**.
  42. Baskir, J.N., T.A. Hatton, and U.W. Suter, *Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems*. Biotechnol Bioeng, 1989. **34**(4): p. 541-58.
  43. Burgess, D.J. and A.J. Hickey, *Microsphere Technology and Applications*, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J.B. Swarbrick, James C., Editor. 1994, Marcell Dekker, Inc.: New York, Basel, Hong Kong. p. 1-31.
  44. Bruschi, M.L., et al., *Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens*. Drug Dev Ind Pharm, 2006. **32**(2): p. 229-38.
  45. Prata, A.S., et al., *Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2008. **67**(2): p. 171-8.
  46. Devy, J., et al., *Hydroxyethylstarch microcapsules: a preliminary study for tumor immunotherapy application*. Int J Pharm, 2006. **307**(2): p. 194-200.
  47. Franssen, O., R.J. Stenekes, and W.E. Hennink, *Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres*. J. Control. Release, 1999. **59**(2): p. 219-28.
  48. Kawaguchi, H., *Functional polymer microspheres*. Prog. Polym. Sci., 2000. **25**: p. 1171±1210.
  49. Dulong, V., et al., *Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization*. Carbohydrate Polymers, 2004. **57**: p. 1-6.
  50. Birnbaum, D.T.B.-P., L., *Microparticle Drug Delivery Systems*. in DDS in Cancer Therapy, D. M. Brown © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2003: p. 117-136.
  51. Nixon, J.R., *Microencapsulation*. 1976, New York [u.a.]: Dekker.
  52. Bungenberg de Jong, v.H.G.K., H. R., *Koazervation (Entmischung in kolloiden Systemen)*. Coll. & Polym. Sci., 1930. **50**(1): p. 39-48.
  53. Müller, B.W., *Controlled drug delivery*. 1987, Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
  54. Sakagami, M. and P.R. Byron, *Respirable Microspheres for Inhalation*. Clin Pharmacokinet, 2005. **44**(3): p. 263-277.
  55. Hanefeld, U., L. Gardossi, and E. Magner, *Understanding enzyme immobilisation*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(2): p. 453-68.
  56. am Ende, M.T. and N.A. Peppas, *Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. II. Diffusion and release studies*. J. of Control. Release, 1997. **48**: p. 47-56.

57. Franssen, O., et al., *Degradable dextran hydrogels: controlled release of a model protein from cylinders and microspheres*. J Control Release, 1999. **60**(2-3): p. 211-21.
58. Chen, L. and M. Subirade, *Chitosan/b-lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers*. Biomaterials, 2005. **26**: p. 6041–6053.
59. Higuchi, T., *Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension*. J. of Pharm. Sci., 1961. **50**(10): p. 874-875.
60. Higuchi, T., *Mechanism of Sustained- Action Medication Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices*. J. of Pharm. Sci., 1963. **52**(12): p. 1145 - 1149.
61. Chen, L. and M. Subirade, *Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 4646–4654.
62. Peppas, N.A., *A model of dissolution-controlled solute release from porous drug delivery polymeric systems*. J Biomed Mater Res, 1983. **17**(6): p. 1079-87.
63. Ritger, P.L. and N.A. Peppas, *A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices*. J. of Control. Release, 1987. **5**: p. 37-42.
64. Ritger, P.L. and N.A. Peppas, *A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs*. J. of Control. Release, 1987. **5**: p. 23-36.
65. Rinaki, E., G. Valsami, and P. Macheras, *The power law can describe the 'entire' drug release curve from HPMC-based matrix tablets: a hypothesis*. Int J Pharm, 2003. **255**(1-2): p. 199-207.
66. van Dijk-Wolthuis, W.N., et al., *Degradation kinetics of methacrylated dextrans in aqueous solution*. J Pharm Sci, 1997. **86**(4): p. 413-7.
67. Wang, W., et al., *Antibody structure, instability, and formulation*. J Pharm Sci, 2007. **96**(1): p. 1-26.
68. Breen, E.D., et al., *Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation*. Pharm Res, 2001. **18**(9): p. 1345-53.
69. Dübel, S., *Handbook of therapeutic Antibodies*. Vol. 1-3. 2007, Weinheim. 693.
70. Ortho Biotech Products, L.P., *Orthoclone OKT® 3 Sterile Solution (muromonab-CD3) Product information*. 2001, Ortho Biotech: Raritan, New Jersey. p. 2.
71. Dimitrov, D., D., et al., *Emerging Therapeutic Concepts II: Nanotechnology*, in *Handbook of Therapeutic Antibodies*, S. Dübel, Editor. 2007: Weinheim. p. 515-532.
72. Dübel, S., *Recombinant therapeutic antibodies*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **74**(4): p. 723-9.
73. Horton, H., R., et al., *Biochemie*. Vol. 4. 2008, München: Pearson Studio. 1057.
74. Beckman, R.A., L.M. Weiner, and H.M. Davis, *Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors*. Cancer, 2007. **109**(2): p. 170-9.
75. Janeway, C., K. Beginnen, and K. Rajewsky, *Immunologie*. 2002: Spektrum Akademischer Verlag.
76. Schirrmann, T., et al., *Production systems for recombinant antibodies*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4576-94.

- 
77. Kroon, D.J., A. Baldwin-Ferro, and P. Lalan, *Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping*. Pharm Res, 1992. **9**(11): p. 1386-93.
  78. Zheng, J.Y. and L.J. Janis, *Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298*. Int J Pharm, 2006. **308**(1-2): p. 46-51.
  79. Lam, X.M., J.Y. Yang, and J.L. Cleland, *Antioxidants for prevention of methionine oxidation in recombinant monoclonal antibody HER2*. J Pharm Sci, 1997. **86**(11): p. 1250-5.
  80. Paborji, M., et al., *Chemical and physical stability of chimeric L6, a mouse-human monoclonal antibody*. Pharm Res, 1994. **11**(5): p. 764-71.
  81. Harrison, J.S., A. Gill, and M. Hoare, *Stability of a single-chain Fv antibody fragment when exposed to a high shear environment combined with air-liquid interfaces*. Biotechnol Bioeng, 1998. **59**(4): p. 517-9.
  82. Mahler, H.C., et al., *Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation*. Eur J Pharm Biopharm, 2005. **59**(3): p. 407-17.
  83. Homayoun, P., et al., *Controlled release of anti-cocaine catalytic antibody from biodegradable polymer microspheres*. J Pharm Pharmacol, 2003. **55**(7): p. 933-8.
  84. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Biochemie*. Vol. 3. 2001, New York: Springer-Verlag Berlin.
  85. Schomburg, D.D., *Brenda Enzymdatenbank*, in *The Comprehensive Enzyme Information System, Institut fuer Biochemie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig*. 2009: Braunschweig. p. Enzym Datenbank.
  86. Canfield, R.E., *The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme*. J Biol Chem, 1963. **238**: p. 2698-707.
  87. Kubler, N.R., et al., *Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system*. Int J Oral Maxillofac Surg, 1998. **27**(4): p. 305-9.
  88. Sommermeyer, D.K., et al., *Hydroxyethyl starch as plasma expander and process for its preparation*. 1990, Fresenius AG: Germany.
  89. Fresenius-Kabi, *HES-Physikochemisches Profil*. 2001. p. 1-11.
  90. Heim, E., et al., *Fluxgate magnetorelaxometry of superparamagnetic nanoparticles for hydrogel characterization*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **311**: p. 150–154.
  91. Chemicals, C.S., *Photoinitiators for UV Curing Key Products Selection Guide*. 2003: Basel. p. 1-8.
  92. Bryant, J.S.N., C.R.; Anseth, K.S., *Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro*. J. of Biomat. Sci. Polym., 2000. **11**(5): p. 439 - 457.
  93. CIBA, *Technical Data Sheet CIBA Irgacure 2959*. 1999, CIBA Speciality Chemicals: Basel. p. 1-3.
  94. Sigma-Aldrich, *Productinformation: Fluorescein isothiocyanate- Dextrane Sigma Stock Nos. FD-4, FD-10S, FD-20S, FD-20, FD-40S, FD-40, FD-70S, FD-70, FD-150S, FD-150, FD-250S, FD-00S, and FD-2000S*. 1997. p. 1-3.
  95. PAA, *Humanseren- Der menschliche Faktor*. 2006. p. 16-20.
  96. Franssen, O., Hennink, Wim E., *A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **168**: p. 1–7.

- 
97. Chemla, R., et al., *Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(26).
  98. Grossman, H.L., et al., *Detection of bacteria in suspension by using a superconducting quantum interference device*. Proc. Nat- Acad. Sci., 2003. **101**(129).
  99. Haller, A., et al., *Magnetic nanoparticle relaxation measured by a low-Tc SQUID system*. Superconductor Sci. & Tech., 1999. **12**: p. 956-958.
  100. Ludwig, F., et al., *Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles with fluxgate magnetometers for the analysis of biological targets*. J. Magnetism & Magnetic Mat, 2005. **293**: p. 690–695.
  101. Eberbeck, D., et al., *Binding kinetics of magnetic nanoparticles on latex beads studied by magnetorelaxometry*. Applied Organometallic Chemistry Materials, Nanoscience and Catalysis, 2004. **18**: p. 542–547.
  102. Ludwig, F., et al., *Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles in magnetically unshielded environment utilizing a differential fluxgate arrangement*. Rev. Sci. Instr., 2005. **76**: p. 106102.1-106102.5.
  103. Heim, E., et al., *Fluxgate magnetorelaxometry for characterization of hydrogel polymerization kinetics and physical entrapment capacity*. J. Phys.: Cond. Mat., 2008. **20**: p. 204106.1-5.
  104. Harling, S., et al. *Fluxgate magnetorelaxometry of superparamagnetic nanoparticles for hydrogel characterization*. in *Tenth European Symposium on Controlled Drug Delivery*. 2008: Published by Elsevier B.V.
  105. Lange, J., et al., *Magnetorelaxometry—a new binding specific detection method based on magnetic nanoparticles*. J. Magnetism and Magnetic Mat., 2002. **252**: p. 381–383.
  106. Hussein, F., *Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Proteinadsorption an Primärpackmitteln*, in *Fakultät für Lebenswissenschaften, Pharmazeutische Technologie, Dissertation*. 2007, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig: Braunschweig. p. 153.
  107. Vollmert, B., *Polymer Chemistry*. 1973, New York: Springer.
  108. Klein, J., J. Stock, and K.-D. Vorlop, *Pore Size and Properties of Spherical Ca-Alginate Biocatalysts*. Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1983. **18**: p. 86-91.
  109. Vollhardt, K.P.C., *Organische Chemie*. Vol. 3. 2000, Weinheim: Wiley-VCH.
  110. Mohr, W., *Rationellen Arztpraxis-Laborwerte*, P.M. Analytik, Editor. 2006: Sindelfingen.
  111. Kozek-Langenecker, S.A., *Effects of hydroxyethyl starch solutions on hemostasis*. Anesthesiology, 2005. **103**(3): p. 654-60.
  112. Kandra, L., et al., *Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary alpha-amylase*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(3): p. 824-8.
  113. Mayer, C.R., et al., *Magnetic Nanoparticles Trapped in pH 7 Hydrogels as a Tool to Characterize the Properties of the Polymeric Network*. Ad. Mater., 2000. **12**(6): p. 417-420.
  114. Franssen, O., O.P. Vos, and W.E. Hennink, *Delayed release of a model protein from enzymatically-degrading dextran hydrogels*. J. of Control. Release, 1997. **44**: p. 237-245.
  115. Rosenqvist, E., et al., *Characterization of a Heat-Stable Fraction of Human IgG*. J. Protein Chem., 1986. **5**(5): p. 323-333.
  116. Kennedy, D.M., A.W. Skillen, and C.H. Self, *Glycation of monoclonal antibodies impairs their ability to bind antigen*. Clin Exp Immunol, 1994. **98**(2): p. 245-51.

117. Hassid, B.W.Z. and H.A. Barker, *The Structure of Dextran synthesized from Sucrose by Betacoccus Arabinosaceus*, Orla-Jensen. J. Biol. Chem., 1940: p. 163-170.
118. Treib, J., et al., *An international view of hydroxyethyl starches*. Intensive Care Med, 1999. **25**(3): p. 258-68.
119. Messmer, K.F., *The use of plasma substitutes with special attention to their side effects*. World J Surg, 1987. **11**(1): p. 69-74.
120. Johansson, G., *Partition of proteins and micro-organisms in aqueous biphasic systems*. Mol Cell Biochem, 1974. **4**(3): p. 169-80.
121. Barisch, S. and R. Daniels. *Influence of sucrose and lysozyme on an aqueous two phase system consisting of hydroxyethylstarch, polyethyleneglycol and water*. in *6th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*. 2008. Barcelona, Spain.
122. Hayashi, C., et al., *Osteoblastic bone formation is induced by using nanogel-crosslinking hydrogel as novel scaffold for bone growth factor*. J Cell Physiol, 2009.
123. Harling, S., *Hydroxyethylstärkederivate-Hydrogele als Drug Delivery Systeme*, in *Institut für Technische Chemie, TU-Braunschweig, Dissertation*. 2009, TU-Braunschweig.
124. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. Angew. Chem. Int. Ed., 2001. **40**(11): p. 2004-2021.
125. Crescenzi, V., et al., *Novel Hydrogels via Click Chemistry: Synthesis and Potential Biomedical Applications*. Biomacromolecules, 2007. **8**(6): p. 1844-1850.
126. Lutolf, M.P. and J.A. Hubbell, *Synthesis and Physicochemical Characterization of End-Linked Poly(ethylene glycol)-co-peptide Hydrogels Formed by Michael-Type Addition*. Biomacromolecules, 2003. **4**(3): p. 713-722.
127. Prüße, U., et al., *The Jet Cutting Method as a new immobilization technique*. Biotech. Techniques, 1998. **12**(2): p. 105–108.
128. De Geest, B.G., et al., *Synthesis of monodisperse biodegradable microgels in microfluidic devices*. Langmuir, 2005. **21**(23): p. 10275-9.
129. Garnweitner, G. and N. Tsedev. *Multigram synthesis of quasi-monodisperse metal oxide nanoparticles through nonaqueous solution chemistry*. in *E-MRS Fall Meeting 2007*. 2007. Warschau.

---

## Lebenslauf

Geburt: 26.08.1979 in Limburg a. d. Lahn

### Schulbildung:

1999 Beendigung der Schullaufbahn mit Erlangen des Abiturs am  
Gymnasium Trittau

### Studium, Famulatur und Praktisches Jahr:

1999 - 2004 Studium der Pharmazie an der  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.  
2002 1. Staatsexamen abgeschlossen  
2004 2. Staatsexamen abgeschlossen  
2005 3. Staatsexamen/Approbation abgeschlossen  
27.03.2000 - 22.04.2000  
Vierwöchige Famulatur in der Post Apotheke, Trittau  
07.08.2000 - 01.09.2000  
Vierwöchige Famulatur bei  
Allergopharma Joachim Ganzer KG, Reinbek  
01.05.2004 - 31.10.2004  
Erste Hälfte des Praktischen Jahres bei  
Martindale Pharmaceuticals, Romford/London, GB  
01.11.2004 - 30.04.2005  
Zweite Hälfte des Praktischen Jahres in der  
Lederle Apotheke, Freiburg i. Br.

### Berufserfahrung

01.09.2005 - 31.10.2008  
Roland Apotheke Braunschweig  
01.08.2005-30.04.2009  
wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU-Braunschweig